



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 290 152**

⑤1 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **01946896 .6**
⑧6 Fecha de presentación : **29.01.2001**
⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1250445**
⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **23.10.2002**

⑤4 Título: **Expresión específica en la raíz de genes deseados en plantas.**

③0 Prioridad: **28.01.2000 US 493803**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2008

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2008

⑦3 Titular/es:
The Governors of the University of Alberta
222 Campus Tower, 8625-112 Street
Edmonton, Alberta T6G 2E1, CA

⑦2 Inventor/es: **Good, Allen, G.**

⑦4 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Expresión específica en la raíz de genes deseados en plantas.

5 Antecedentes de la invención

Los factores clave en el procedimiento mediante el cual las plantas crecen y florecen son la disponibilidad de los nutrientes para la planta y la capacidad de la planta para tomar y utilizar estos nutrientes de manera eficaz. En general, las plantas tienen dos caminos de entrada para los nutrientes: las raíces y las hojas. En la mayoría de las plantas, los elaborados sistemas de raíces sirven para hacer de interfaz y absorber nutrientes del suelo o el agua circundantes en los que crece la planta. Para aumentar el área de superficie disponible para ponerse en contacto con los nutrientes y absorberlos, muchas plantas han desarrollado una estructura de raíces que incluye un gran número de pelos radicales: células del epitelio radical especialmente diferenciadas parecidas a un pelo que sobresalen desde la estructura principal de la raíz hacia el medio circundante. Los nutrientes que se pueden encontrar fácilmente en muchos suelos y entornos a base de agua y que se pueden absorber por la raíz incluyen, por ejemplo, agua, nitrógeno, fósforo, magnesio, potasio y azufre.

Sin embargo, un nutriente que se obtiene solamente de manera ineficaz a través de las raíces es el dióxido de carbono. Las plantas fijan el dióxido de carbono en glucosa a través de la fotosíntesis; por lo tanto, la captación del dióxido de carbono es importante y decisiva para el crecimiento continuo y la supervivencia de la planta. La mayor parte de la captación de dióxido de carbono en la mayoría de las plantas se produce a través de las hojas desde el aire circundante. Unas pocas plantas (por ejemplo, las orquídeas) prescinden de la captación de nutrientes mediante las raíces en favor de un sistema de captación basado solamente en las hojas (en el cual, por ejemplo, las hojas toman los nutrientes disueltos en el agua), pero la mayor parte de las plantas utilizan ambos sistemas de absorción de nutrientes por medio de raíces y de hojas.

Muchos nutrientes tomados por las plantas requieren un procesamiento antes de convertirse en utilizables para las vías metabólicas de las plantas. El nitrógeno es uno de estos nutrientes y es también, junto con el fósforo y el potasio, uno de los tres nutrientes principales que limitan el crecimiento de la planta. A menudo, las fuentes de nitrógeno son los principales componentes en los fertilizantes (Hageman y Lambert, 1988, En: *Corn and Corn Improvement*, 3ª edición, Sprague & Dudley, American Society Agronomy, pp. 431-461). Dado que el nitrógeno es normalmente el elemento limitante de la velocidad en el crecimiento de la planta, la mayoría de los cultivos en el campo tienen una dependencia fundamental de los fertilizantes con nitrógeno inorgánico. Normalmente, la fuente de nitrógeno en los fertilizantes es el nitrato de amonio, el nitrato de potasio o la urea. Un porcentaje importante de los costes asociados con la producción de cultivos viene de las aplicaciones de fertilizantes necesarias. Sin embargo, se sabe que la mayoría del nitrógeno aplicado es eliminado rápidamente por los microorganismos del suelo, la lixiviación y otros factores, en vez de ser tomado por las plantas.

Las plantas toman el nitrógeno principalmente tanto en forma nitrato (NO_3^-) como en forma de amonio (NH_4^+). Algunas plantas son capaces de utilizar la reserva de N_2 atmosférico a través de una asociación simbiótica con las bacterias que fijan el N_2 o con ascomicetos. En los suelos que no son ácidos y están bien aireados, las plantas toman el NO_3^- , que convierten en NH_4^+ . En los suelos ácidos, el NH_4^+ es la forma predominante de nitrógeno inorgánico presente y puede ser tomado directamente por las plantas. Luego, el NH_4^+ se convierte en glutamina y glutamato mediante las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT). La glutamina y el glutamato se pueden convertir en una serie de aminoácidos, tal y como se muestra en la Figura 1.

Aunque algunos nitratos y el amoniaco se pueden detectar en los vasos transportadores (xilema y floema), la mayoría del nitrógeno se asimila primero en forma orgánica (por ejemplo, aminoácidos) que, luego, se transportan por dentro de la planta. La glutamina, la asparragina y el aspartato parecen ser importantes para determinar la capacidad de tomar nitrógeno que tienen las plantas, ya que representan los principales compuestos para el transporte del nitrógeno a larga distancia en las plantas y son abundantes en la savia del floema. Además de sus funciones comunes como vehículos del nitrógeno, estos aminoácidos tienen unas funciones algo diferentes en el metabolismo del nitrógeno de las plantas. La glutamina es más activa metabólicamente y puede dar directamente su nitrógeno amida a un gran número de sustratos. Debido a su reactividad, las plantas generalmente no utilizan la glutamina para almacenar el nitrógeno. En cambio, la asparragina es un compuesto más eficaz para el transporte y el almacenamiento del nitrógeno en comparación con la glutamina debido a su mayor proporción de N:C. Además, la asparragina también es más estable que la glutamina y se puede acumular en más cantidad en las vacuolas. De hecho, en las plantas que tienen alta capacidad asimilatoria de nitrógeno, la asparragina tiene un papel dominante en el transporte y el metabolismo del nitrógeno (Lam *et al.*, 1995, *Plant Cell*: 887-898). Debido a su estabilidad relativa, la asparragina no participa directamente en el metabolismo del nitrógeno, pero debe ser hidrolizada primero por la enzima asparraginasa (ANS) para producir aspartato y amonio que, luego, se pueden utilizar en la síntesis de los aminoácidos y las proteínas.

Sin embargo, además del aspartato y la asparragina, otra serie de aminoácidos pueden actuar como compuestos de almacenamiento. Se ha demostrado que la cantidad total de aminoácidos libres cambia con los estreses específicos, tanto biótico como abiótico, con diferentes sistemas de fertilizantes y con otros factores (Bohnert *et al.*, 1995, *Plant cell* 7: 1099-1111). Por ejemplo, durante el estrés por sequía, muchas plantas mantienen su turgencia mediante un ajuste osmótico (Turner, 1979, *Stress Physiology in Crop Plants*, pp. 181-194). El ajuste osmótico, a saber, un aumento neto de solutos que conduce a una disminución del potencial osmótico, es uno de los principales mecanismos mediante

los cuales los cultivos se pueden adaptar a la disponibilidad limitada de agua (Turner, *ibídem*; Morgan, 1984, *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 35: 299-319). Los solutos que se acumulan durante el ajuste osmótico incluyen azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos, tales como alanina, aspartato, prolina y betaína de glicina (Good y Zaplachinski, 1994, *Physiol. Plant.* 90: 9-14; Hanson y Hitz, 1982, *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 33: 163-203; Jones y Turner, 1978, *Plant Physiol.* 61: 122-126). Se ha demostrado que el maíz, el algodón, la soja y el trigo realizan un ajuste osmótico durante la sequía (Morgan, *ibídem*). Una de las respuestas osmorreguladoras mejor caracterizadas es la acumulación de prolina (Hanson y Hitz, *ibídem*). En algunos tejidos, la cantidad de prolina aumenta hasta 100 veces en respuesta al estrés osmótico (Voetberg y Sharp, 1991, *Plant Physiol.* 96: 1125-1130). La acumulación de prolina es el resultado de un aumento del flujo de glutamato a pirrolina-5-carboxilato y prolina en la vía biosintética de la prolina, así como de una disminución del ritmo del catabolismo de la prolina (Rhodes *et al.*, 1986, *Plant Physiol.* 82: 890-903; Stewart *et al.*, 1977, *Plant. Physiol.* 59: 930-932). Se ha demostrado que las concentraciones de la alanina y el aspartato aumentan 3,6 y 4,1 veces, respectivamente, durante el estrés por sequía en las hojas de *Brassica napus*, mientras que la cantidad de glutamato aumenta 5,5 veces (Good y MacLagan, 1993, *Can. J. Plant. Sci.* 73: 525-529). Las concentraciones de la alanina disminuyeron después de volver a regar las plantas mientras que las concentraciones del aspartato continuaron siendo altas. Las concentraciones del piruvato mostraron una pauta similar, aumentando 2,2 veces después de 4 días de sequía, tras lo cual se volvieron a las concentraciones del control con la rehidratación. Sin embargo, las concentraciones del 2-oxoglutarato continuaron siendo relativamente constantes durante el estrés por sequía y la rehidratación. Uno de los factores que puede determinar el valor de un aminoácido específico como un osmoprotector puede ser su uso como un compuesto de almacenamiento de carbono o nitrógeno.

La alanina es uno de los aminoácidos más comunes en las plantas. En las hojas de *Brassica* en condiciones normales, las concentraciones de alanina y de aspartato son aproximadamente iguales y se ha encontrado que son el doble de la concentración de asparragina. En comparación, las concentraciones de glutamato fueron el doble de las de la alanina o el aspartato (Good and Zaplachinski, *ibídem*). La alanina es sintetizada por la enzima alanina aminotransferasa (AlaAT) a partir de piruvato y glutamato en una reacción reversible (Goodwin y Mercer, 1983, *Introduction to Plant Biochemistry* 2ª edición, Pergamon Press, Nueva York, N. Y., pp. 341-343), tal y como se muestra en la Figura 2. Además de la sequía, la alanina es un aminoácido que se sabe que aumenta en otras condiciones medioambientales específicas tales como el estrés anaerobio (Muench y Good, 1994, *Plant. Mol. Biol.* 24: 417-427; Vanlerberge *et al.*, 1993, *Plant. Physiol.* 95: 655-658). Se sabe que la concentración de la alanina aumenta sustancialmente en el tejido radical con un estrés anaerobio. Como ejemplo, en raíces de la cebada, la concentración de la alanina aumenta 20 veces después de 24 horas de estrés anaerobio. También se ha demostrado que el gen de la alanina aminotransferasa se induce por luz en el mijo y cuando las plantas se están recuperando de un estrés de nitrógeno (Son *et al.*, 1992, *Arch. Biochem. Biophys.* 289: 262-266). Vanlerberge *et al.* (1993) han demostrado que en las algas anaerobias en ayuno de nitrógeno, la adición de nitrógeno en forma de amonio dio lugar a la incorporación directa en alanina del 93% de una marcación con ¹⁵N. Por lo tanto, la alanina es un aminoácido importante en la respuesta de las plantas a las condiciones extremas.

Se han clonado y estudiado los genes del transportador de nitrato, la nitrato reductasa (NR) y la nitrito reductasa (NiR) (Crawford, 1995, *Plant Cell*, 7: 859-868; Cheng *et al.*, 1988, *EMBO J.* 7: 3309-3314), como también muchos de los genes que codifican enzimas implicadas en la asimilación y el metabolismo del nitrógeno en las plantas. Se han clonado la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintetasa (GOGAT) (Lam *et al.*, *ibídem*; Zehnacker *et al.*, 1992, *Planta* 187: 266-274; Peterman y Goodman, 1991, *Mol. Gen. Genet.* 230: 145-154) al igual que la asparraginasa (ANS) y la aspartato aminotransferasa (AspAT) (Lam *et al.*, *ibídem*; Udvardi y Kahn, 1991, *Mol. Gen. Genet.* 231: 97-105). Se ha clonado un gen de la asparraginasa sintetasa (AS) a partir del guisante (Tsai y Coruzzi, 1990, *EMBO J.* 9: 323-332). Se ha clonado la glutamato deshidrogenasa del maíz (Sakakibara *et al.*, 1995, *Plant. Cell. Physiol.* 36 (5): 789-797). Se ha clonado la alanina aminotransferasa por Sonet *et al.* (1993, *Plant. Mol. Biol.* 20: 705-713) y por Muench y Good, (1994, *Plant. Mol. Biol.* 24: 417-427). Entre los genes de asimilación y utilización del nitrógeno por las plantas, los estudiados con más extensión son los genes de la glutamina sintetasa y de la asparragina sintetasa.

En las plantas, la ingeniería genética de los procesos de asimilación del nitrógeno ha producido resultados diferentes. Muchos estudios que examinan la sobreexpresión constitutiva de la glutamina-sintetasa (GS) no han podido describir ningún efecto positivo de su sobreexpresión en el crecimiento de las plantas. Estos estudios incluyen, por ejemplo: Eckes *et al.* (1989, *Molec. Gen. Genet.* 217: 263-268) que utilizan plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan la GS de la alfalfa; Hemon *et al.* (1990, *Plant. Mol. Biol.* 15: 895-904) que utilizan plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan la GS de las judías en el citoplasma o la mitocondria; y Hirel *et al.* (1992, *Plant. Mol. Biol.* 20: 207-218) que utilizan plantas de tabaco transgénicas que sobreexpresan la GS de la soja. Un estudio, de Temple *et al.*, (1993, *Mol. Gen. Genet.* 236: 315-325) ha descrito aumentos en el contenido total de proteínas solubles en las plantas de tabaco transgénicas que sobreexpresan un gen de la GS de la alfalfa y aumentos similares en el contenido de proteínas solubles totales en las plantas de tabaco transgénicas que expresan el ARN antisentido para un gen de GS. El documento WO 97/30163 describe un aumento de la biomasa observado en las plantas transformadas con el gen de la alanina aminotransferasa bajo el control del promotor del gen 26 de la turgencia de *Brassica* y cultivadas en condiciones con poco nitrógeno, en comparación con los controles.

Se ha descrito un caso en el que las plantas modificadas para sobreexpresar de manera constitutiva un gen de la GS de la alfalfa crecen más rápido que las plantas de tipo salvaje de control (Eckes *et al.*, 1988, Solicitud de Patente Australiana publicada nº 17321/88). En otra descripción (Coruzzi y Brears, 1994, documento WO 95/09911) se introdujeron construcciones de GS, GOGAT y AS bajo el control de un promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CamMV35S). Este documento demostró que las plantas transgénicas aumentaban el peso

fresco y tenían una ventaja de crecimiento sobre los controles. Así, no parece existir una dirección clara sobre el efecto de la sobreexpresión constitutiva de las enzimas de la asimilación del nitrógeno sobre el crecimiento de las plantas.

Al igual que el nitrógeno, el agua constituye otro nutriente de la planta muy importante. El mantenimiento del crecimiento y el funcionamiento normales en las plantas depende de un contenido intracelular de agua relativamente elevado. La sequía, la baja temperatura y la elevada salinidad son condiciones medioambientales extremas que alteran el equilibrio celular del agua y que limitan significativamente el crecimiento de la planta y el rendimiento del cultivo (Morgan, *ibídem*). Muchos procesos fisiológicos cambian en respuesta a condiciones que reducen el potencial celular del agua, entre ellos, la fotosíntesis, la apertura de los estomas y el crecimiento de las hojas, el tallo y las raíces (Hanson y Hitz, *ibídem*). Junto con las respuestas fisiológicas, se pueden producir cambios metabólicos durante la pérdida de agua. Uno de los cambios más notables se encuentra en la síntesis y la acumulación de compuestos osmóticamente activos de baja masa molecular, tal como se describió anteriormente.

Los cambios en la expresión génica también se producen durante la presión osmótica. Recientemente, se ha descrito una serie de genes que se inducen con la sequía (revisado por Skiver y Mundy, 1990, *Plant Cell* 2: 503-512).

Es un objeto de la invención el superar las desventajas de la técnica anterior.

El objeto anterior se satisface mediante las combinaciones de las características de la reivindicación principal, y las subreivindicaciones describen realizaciones ventajosas adicionales de la invención.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona un método para dirigir la expresión específica en la raíz de un gen deseado, que comprende: producir una planta a partir de una célula de una planta transformada de tal manera que la expresión de un gen deseado se produzca preferiblemente en la raíz, en el que la célula de la planta transformada comprende un gen deseado que está unido operativamente a un elemento promotor del gen 26 de la turgencia de *Brassica*, tal y como se define en la SEQ ID NO: 1, o un fragmento del mismo cuyo fragmento dirige la expresión del gen deseado preferiblemente en la raíz.

La expresión del gen deseado se puede regular adicionalmente por el entorno o por el desarrollo. El gen deseado puede codificar una enzima implicada en la asimilación y/o el metabolismo del nitrógeno. Por ejemplo, la enzima puede ser alanina deshidrogenasa, glutamina sintetasa, asparragina sintetasa, glutamato sintasa, asparraginasa, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa o glutamato deshidrogenasa.

El método de la invención se puede realizar en una planta tal como canola, cebada, maíz, arroz, tabaco, soja, algodón, alfalfa, tomate, trigo o patata.

El fragmento de un elemento promotor del gen 26 de la turgencia de *Brassica*, tal y como se define en la SEQ ID NO: 1, que dirige la expresión del gen deseado preferentemente en la raíz, puede ser, por ejemplo, el fragmento definido en una de las SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 5 ó 6.

Las plantas se enfrentan a una amplia variedad de condiciones medioambientales que no le son óptimas durante su crecimiento y desarrollo. Tales condiciones pueden incluir la limitación del agua, el exceso de salinidad, un suelo alcalino o ácido, la infestación por plagas, enfermedad o el estrés por temperatura, cualquiera de las cuales por separado puede perjudicar significativamente el crecimiento y/o el rendimiento del cultivo. La presente invención proporciona nuevos métodos mediante los cuales las plantas, y las semillas de las mismas, se pueden modificar genéticamente para que crezcan y florezcan en condiciones medioambientales que normalmente no conducen al desarrollo de la planta. La invención proporciona métodos mediante los cuales uno o más genes seleccionados (por ejemplo, genes cuyos productos pueden mejorar la capacidad de la planta para crecer y florecer bajo una o más condiciones medioambientalmente adversas) se pueden expresar en la raíz. Además, es posible, según los métodos de la invención, expresar el gen o los genes seleccionado(s) en la raíz de una forma inducible, de tal manera que la expresión del producto del gen se pueda producir solamente bajo las condiciones medioambientales, temporales o de desarrollo deseadas, o en respuesta a un acontecimiento específico (por ejemplo, lesión por una plaga). Utilizando los métodos de la invención, se pueden mejorar las plantas para su crecimiento y desarrollo en condiciones medioambientales normalmente inadecuadas para el crecimiento de la planta. Además, los métodos de la invención permiten la ingeniería genética de una planta para alterar una o más características de la planta solamente en determinados tejidos de la planta.

La expresión del gen deseado puede estar regulada además por el entorno o por el desarrollo. La expresión regulada por el entorno o por el desarrollo puede tener lugar en condiciones de estrés osmótico.

En una realización preferida de la presente invención, el gen deseado se selecciona del grupo que incluye: genes que codifican proteínas que alteran el contenido en nutrientes, genes que codifican proteínas implicadas en la fitoremediación, genes que codifican proteínas que confieren resistencia a los plaguicidas, genes que codifican proteínas estructurales, genes que producen proteínas o enzimas farmacéuticas que producen compuestos farmacéuticos, genes que codifican proteínas implicadas en la captación o la utilización de los nutrientes y genes que codifican proteínas implicadas en el crecimiento de la planta. En otra realización preferida, la expresión del gen deseado también está regulada por el entorno o por el desarrollo.

También se describe en la presente memoria una semilla que contiene un gen unido operativamente a un elemento regulador genético que dirige la expresión específica de raíz del gen deseado. El gen deseado se puede seleccionar entre el grupo que consiste en: genes que codifican proteínas que alteran el contenido en nutrientes, genes que codifican proteínas implicadas en la fitorremediación, genes que codifican proteínas que confieren resistencia a los plaguicidas, genes que codifican proteínas estructurales, genes que producen proteínas o enzimas farmacéuticas que producen compuestos farmacéuticos, genes que codifican proteínas implicadas en la captación o utilización de los nutrientes y genes que codifican proteínas implicadas en el crecimiento de la planta. La expresión del gen deseado también puede estar regulada por el entorno o por el desarrollo.

Un método para aumentar la biomasa de una planta que crece en una o más condiciones medioambientalmente adversas puede comprender:

transformar una planta con un gen deseado unido operativamente con un elemento promotor de *btg-26* para producir una planta transformada, codificando el gen deseado una enzima implicada en la asimilación o el metabolismo del nitrógeno; y

hacer crecer la planta transformada. Preferiblemente, la enzima es la AlaAT.

Un método para aumentar la biomasa de una planta que crece en condiciones de contenido bajo en nitrógeno puede comprender:

transformar una planta con un gen deseado unido operativamente con un elemento promotor de *btg-26* para producir una planta transformada, codificando el gen deseado una enzima implicada en la asimilación del nitrógeno; y

hacer crecer la planta transformada. Preferiblemente, la enzima es la AlaAT.

Un método para aumentar la biomasa de una planta que crece en una o más condiciones medioambientalmente adversas puede comprender:

transformar una planta con un gen que codifica la AlaAT unido operativamente con un elemento del promotor para producir una planta transformada; y

hacer crecer la planta transformada. Preferiblemente, el promotor es *btg-26*.

Un método para aumentar la producción de semillas de una planta puede comprender:

transformar la planta con un gen deseado unido operativamente a un elemento promotor de *btg-26* para producir una planta transformada, codificando el gen deseado una enzima implicada en la asimilación o el metabolismo del nitrógeno; y

hacer crecer la planta transformada. Preferiblemente, la enzima es la AlaAT.

Breve descripción de los dibujos

Éstas y otras características de la invención serán más evidentes a partir de la descripción siguiente en la que se hace referencia a los dibujos anexos en los que:

La Figura 1 muestra las principales vías de la asimilación del nitrógeno y su metabolismo en las plantas. (Adaptado de Lam *et al.*, 1995, *Plant. Cell*, 7: 889 donde se utiliza *Arabidopsis* como un sistema modelo). Se muestran algunas de las enzimas de la asimilación del nitrógeno y las vías del metabolismo de los aminoácidos amidados. Se conocen isoenzimas diferentes para algunas de estas enzimas que pueden tener diferentes funciones en diferentes condiciones medioambientales y tisulares. La asimilación del nitrógeno se produce principalmente a través de las actividades de la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT). Aunque no se indica como tal, la aspartato aminotransferasa también cataliza la reacción inversa. Se proponen las funciones de la glutamato deshidrogenasa (GDH), lo que se indica mediante líneas discontinuas.

La Figura 2 muestra la vía para la biosíntesis de la alanina mediante la enzima alanina aminotransferasa (AlaAT) (De Goodwin y Mercer, 1983).

La Figura 3 muestra la secuencia del ADN del promotor de *btg-26* de *Brassica napus*.

La Figura 4 muestra el análisis cuantitativo por Northern de la expresión de *btg-26*. La Figura 4A muestra el análisis por transferencia Northern de la expresión de *btg-26* durante la sequía. El ARN total (10 mg) de tejido de hoja tomado de plantas de control que tienen un contenido relativo de agua del 97% (CRA del 97%) y de plantas deshidratadas al CRA en % que se indica, se fraccionó en gel de agarosa al 1,2% con formaldehído y se hibridó con el ADN genómico de *btg-26*. La Figura 4B muestra el análisis cuantitativo de la inducción del *btg-26*. Cada punto del tiempo representa la inducción media determinada a partir de tres transferencias en ranura independientes y de dos transferencias de tipo

Northern. Se volvieron a hibridar todas las transferencias con un control de ADNc de ciclofilina para corregir el error de carga. La inducción se determina respecto al nivel de expresión en las plantas completamente hidratadas (97%). La Figura 4C muestra el análisis por transferencia de tipo Northern de la expresión de btg-26 durante la aclimatación al frío y el choque térmico. El ARN total (10 mg) de tejido foliar se tomó de las plantas de control (C) o de las plantas expuestas a 4°C durante uno o cuatro días o expuestas a 40°C durante dos o cuatro horas. Se fraccionó el ARN en un gel de agarosa al 1,2% con formaldehído y se hibridó con el ADN genómico de btg-26. La Figura 4D muestra el análisis por transferencia de tipo Northern de la expresión de btg-26 durante el estrés por salinidad. El ARN total (10 mg) del tejido foliar se tomó de las plantas de control (C) o de las plantas expuestas al estrés por salinidad regándolas con NaCl a 50 mM (S50), NaCl a 150 mM (S150) o NaCl a 450 mM (S450) durante uno o cuatro días. Se fraccionó el ARN en un gel de agarosa al 1,2% con formaldehído y se hibridó con el ADN genómico de btg-26. La Figura 4E muestra el análisis por transferencia de tipo Northern de la expresión de btg-26 durante la exposición al ácido abscísico (ABA). El ARN total (10 mg) del tejido foliar se tomó de las plantas bañadas durante un día en una disolución que contiene o bien ABA a 0 µM (-) o bien ABA a 100 µM (+). Se fraccionó el ARN en un gel de agarosa al 1,2% con formaldehído y se hibridó con el ADN genómico de btg-26.

La Figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida del ADNc de la AlaAT de la cebada.

La Figura 6 muestra la construcción plasmídica p25.

La Figura 7 muestra las construcciones que contienen la región codificante de la AlaAT y los promotores CaMV, btg-26 y trg-31 que se utilizaron para la transformación de las plantas de *Brassica napus*. La Figura 7A muestra pCa2/AlaAT/NOS; la Figura 7B muestra pbtg-26/AlaAT/NOS; y la Figura 7C muestra ptrg-31/AlaAT/NOS.

La Figura 8 muestra la construcción plasmídica pCGN1547 utilizada para producir los transformantes que sobre-expresan la AlaAT o con la AlaAT inducible por sequía.

La Figura 9 muestra las plantas de *Brassica napus* cultivadas en condiciones carentes de nitrógeno durante 3 semanas seguidas de sequía durante 3 días. Las plantas se identifican como A, B y C tal y como sigue: la planta A es una planta de tipo salvaje de control; la planta B contiene una construcción CaMV/AlaAT y la planta C contiene una construcción btg-26/AlaAT.

La Figura 10 muestra la tinción *in vivo* con GUS de las plantas transgénicas btg-26/GUS. El panel A muestra las plantas de tipo salvaje a la izquierda y las plantas transgénicas a la derecha. El panel B muestra las puntas de las raíces de las plantas transgénicas teñidas. El panel C muestra una sección transversal de la zona de absorción de las puntas de las raíces de las plantas transgénicas. El panel D muestra una sección transversal de la zona de división de las puntas de las raíces de las plantas transgénicas.

La Figura 11 muestra la actividad GUS de los brotes frente a la actividad GUS de las raíces de las plantas transgénicas btg-26/GUS. Esta figura muestra un gráfico de barras de la cantidad de actividad GUS presente en los extractos de raíces y brotes de las plantas que expresan el transgén btg-26/GUS, y la proporción raíces:brotes de la actividad GUS en estas plantas.

La Figura 12 muestra el análisis por transferencia de tipo Southern de las reacciones de RT-PCR que amplifican la AlaAT a partir del ARN total de hoja (L) y raíz (R). El análisis densitométrico relativo del producto de 381 pb de la RT-PCR se indica debajo de cada línea.

La Figura 13 muestra la actividad AlaAT en las hojas transgénicas (btg-26/AlaAT) y de control (de tipo salvaje) en condiciones con nitrógeno a concentración elevada o baja.

La Figura 14 muestra la actividad AlaAT en los brotes de tipo salvaje, cv. *Westar*, y en las plantas transgénicas de la estirpe 81B con btg-26/AlaAT cultivadas hidropónicamente con nitrato a 0,5 mM después de 36 horas con un tratamiento de sales.

La Figura 15 muestra la actividad AlaAT en las raíces de tipo salvaje, cv. *Westar*, y en las plantas transgénicas de la estirpe 81B con btg-26/AlaAT cultivadas hidropónicamente con nitrato a 0,5 mM después de 36 horas con un tratamiento de sales.

La Figura 16 muestra el efecto de la salinidad sobre la acumulación de biomasa de las plantas de tipo salvaje, cv. *Westar*, y de plantas transgénicas de la estirpe 81B con btg-26/AlaAT. El panel A muestra brotes de tipo salvaje, el panel B muestra brotes de btg-AlaAT, el panel C muestra raíces de tipo salvaje y el panel D muestra raíces de btg-26/AlaAT.

La Figura 17 muestra el efecto de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas de tipo salvaje, cv. *Westar*, y de las plantas transgénicas de la estirpe 81B de btg-26/AlaAT. Las plantas de tipo salvaje se encuentran en el lado izquierdo de la figura y las plantas transgénicas se encuentran en el lado derecho de la figura.

La Figura 18 muestra la inmunolocalización de la proteína AlaAT expresada en las plantas de tipo salvaje y las

transgénicas (btg-26/AlaAT). El panel A muestra la raíz sin tratar de tipo salvaje de control, el panel B muestra la raíz sin tratar transgénica, el panel C muestra la raíz de tipo salvaje tratada con NaCl a 150 mM y el panel D muestra la raíz transgénica tratada con NaCl a 150 mM.

La Figura 19 muestra el aumento en la biomasa vegetal en las plantas transgénicas que expresan btg-26/AlaAT en condiciones de campo y tratadas con un fertilizante que contiene una cantidad baja o elevada de nitrógeno. La Figura 19A muestra el peso seco obtenido de las plantas transgénicas que expresan btg-26/AlaAT (53F y 81B) y las plantas de control (*Westar*). La Figura 19B muestra las producciones de semillas (g/parcela recolectada) obtenidas de las plantas transgénicas que expresan btg-26/AlaAT (53F y 81B) y de las plantas de control (*Westar*).

Descripción de la realización preferida

La siguiente descripción es de una realización preferida a modo de ejemplo solamente y sin limitar la combinación de características necesarias para llevar a cabo la invención.

I. Definiciones

La terminología “expresión histoespecífica de un gen deseado” se conoce en la técnica e incluye la expresión de un gen deseado solamente en determinados tejidos; aunque el gen deseado puede estar presente en muchos tejidos, se expresa solamente en un subconjunto de esos tejidos. Tal expresión selectiva se puede deber a la influencia de uno o más elementos genéticos reguladores, por ejemplo, elementos de promotores, represores o potenciadores.

La terminología “gen deseado” se reconoce en la técnica e incluye cualquier gen que se expresa deseablemente en uno o más tejidos vegetales determinados. Ejemplos de genes deseados que se pueden utilizar ventajosamente junto con los métodos de la invención incluyen los genes de asimilación y/o utilización del nitrógeno, los genes de resistencia al estrés, los genes de resistencia a las enfermedades y las plagas y los genes relacionados con la captación y la utilización de los nutrientes.

La terminología “planta” se reconoce en la técnica e incluye cualquier planta monocotiledónea o dicotiledónea. Las plantas preferidas a utilizar en la invención incluyen canola, cebada, maíz, arroz, tabaco, soja, algodón, alfalfa, tomate, trigo, patata y algunos géneros de árboles, incluidas las especies de coníferas y de *Populus*.

La terminología “unido operativamente” se reconoce en la técnica e incluye la colocación de un gen deseado respecto a una secuencia reguladora de ácido nucleico de tal forma que la expresión del gen deseado es controlada por la secuencia reguladora. Esta secuencia reguladora puede tener un efecto positivo sobre la expresión del gen deseado (por ejemplo, la secuencia reguladora es un promotor o un elemento potenciador), o la secuencia reguladora puede tener un efecto negativo sobre la expresión del gen deseado (por ejemplo, la secuencia reguladora es un elemento represor). La secuencia reguladora puede estar localizada físicamente en 5' o 3' del gen deseado, puede estar dentro de la secuencia codificante del gen deseado o puede estar contenida en un intrón dentro del gen deseado.

La terminología “fitorremediación” se reconoce en la técnica e incluye la utilización de una o más plantas con el propósito de extraer compuestos del suelo o del agua que son perjudiciales para los humanos o los animales y bien a) almacenar estos compuestos en la masa de la planta para desecharlos de la manera más conveniente o, preferiblemente, b) convertir estos compuestos dentro de la planta en sustancias menos perjudiciales.

Métodos de la invención

La presente invención está diseñada para la producción de plantas que expresan uno o más genes deseados de una forma específica de raíz. Se describen semillas que contienen uno o más genes deseados bajo el control de un elemento del promotor que dirige específicamente la expresión específica de raíz del gen. Mediante los métodos de la invención, es posible producir plantas que tengan uno o más rasgos o propiedades deseados en determinados tejidos; por ejemplo, para alterar específicamente las propiedades genéticas y/o fisiológicas de las raíces de la planta. La invención proporciona métodos para producir plantas que tengan una expresión específica de raíz de uno o más genes deseados, utilizando el elemento del promotor de la proteína 26 de la turgencia de *Brassica*.

En una realización, la invención proporciona un método para dirigir la expresión específica de raíz de uno o más genes deseados en una planta, en el que la planta se produce a partir de una célula vegetal que contiene el gen deseado unido operativamente a un elemento regulador genético que dirige la expresión específica de raíz del(os) gen(es) deseado(s), de tal forma que la planta tiene la expresión del gen deseado dentro de una raíz. El elemento regulador genético es un elemento del promotor del gen 26 de la turgencia de *Brassica*.

En otra realización, la invención proporciona un método para dirigir la expresión específica de raíz y la expresión específica del entorno o del desarrollo de uno o más genes en una planta, en el que la planta se produce a partir de una célula vegetal que contiene el gen deseado unido operativamente con un elemento regulador genético que dirige la expresión específica de la raíz y la expresión específica del entorno o del desarrollo del (de los) gen(es) deseado(s), de tal forma que la planta tiene la expresión del gen deseado sólo en las condiciones determinadas de entorno o de desarrollo y dentro de la raíz de la planta. El elemento regulador genético es un elemento del promotor del gen 26 de la turgencia de *Brassica* y la condición ambiental deseada es preferiblemente el estrés por sequía o estrés salino.

En la presente memoria se describen semillas que contienen construcciones en las que un promotor dirige tanto la expresión histoespecífica y opcionalmente específica del entorno o del desarrollo de uno o más genes deseados.

Los métodos de la invención se explican además más adelante.

Construcciones genéticas de la invención

A. Elementos reguladores genéticos

Los métodos para la producción de plantas que tienen expresión histoespecífica de uno o más genes deseados se llevan a cabo mediante el uso de un elemento regulador genético que dirige la expresión histoespecífica del (de los) gen(es) deseado(s). Los elementos reguladores pueden ser tanto negativos como positivos en cuanto a la actividad: un promotor o potenciador histoespecífico vegetal permite la expresión del (de los) gen(es) deseado(s) en uno o más tejidos específicos, mientras que un represor histoespecífico vegetal suprime la expresión de los genes deseados en uno o más tejidos específicos, mientras que la expresión en el (los) otro(s) tejido(s) no disminuye. Para los propósitos de la invención, se entenderá que las secuencias promotoras constituyen los elementos reguladores genéticos de la invención.

Los promotores histoespecíficos pueden ser tanto homólogos como heterólogos para la planta con la cual se van a utilizar. Por ejemplo, se pueden utilizar promotores que dirigen la expresión histoespecífica de un gen en las plantas, pero que se obtienen de, por ejemplo, virus, bacterias, insectos o animales. Se pueden utilizar promotores que dirigen la expresión de un gen unido operativamente en uno o más tejidos vegetales mientras que se excluye la expresión del gen unido en uno o más tejidos vegetales diferentes. Los tejidos vegetales adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos, por ejemplo, raíz, hoja, pétalo, sépalo, estambre, antera, estigma, ovario, estilo, pistilo, epidermis, floema, xilema, corteza, médula, cambium, tallo o tronco, pelo radical, pecíolo, fruto y tubérculo.

El experto en la técnica entenderá que se pueden realizar modificaciones en los promotores útiles en los métodos de la invención para mejorar o modular la actividad del promotor. Se pueden unir operativamente muchas copias de un promotor determinado a un solo gen deseado para así alterar el nivel de expresión del gen unido, o se puede unir operativamente un promotor determinado a uno o más genes deseados de tal forma que la expresión de cada gen deseado se regule de manera coordinada. Un promotor puede tener cualquier tamaño adecuado para permitir el funcionamiento histoespecífico del promotor. Se puede modificar un promotor (por ejemplo, mediante mutagénesis, delección, inserción o truncamiento) para alterar el grado al que el gen unido operativamente se expresa en el tejido determinado, o para alterar la especificidad de la expresión de tejido dirigida por el promotor. Además, se puede modular la colocación del promotor respecto al gen deseado unido operativamente (por ejemplo, ponerlos más lejos o más cerca) para conseguir el nivel deseado de expresión dirigida por el promotor.

En una realización, el promotor no sólo dirige la expresión de un gen unido operativamente en uno o más tejidos vegetales determinados, sino que también dirige la expresión del gen en respuesta a una condición medioambiental o fisiológica específica. Por ejemplo, se puede activar el promotor en condiciones extremas (por ejemplo, estrés por sequía, estrés salino, estrés por temperatura, estrés por oxígeno, estrés por pH, o estrés por metales pesados), en condiciones de carencia de nutrientes, en condiciones de ataque por enfermedades o plagas, o en condiciones de desarrollo específicas (por ejemplo, al aparecer los brotes, los frutos o al producir semillas). Mediante el uso de tal promotor, es posible activar la expresión de un gen deseado tanto de una manera histoespecífica y de una manera específica de la condición.

El promotor a utilizar en los métodos de la invención es el promotor del gen 26 de la turgencia de *Brassica* (btg-26), cuya secuencia se expone como SEQ ID NO:1, y la expresión del gen unido operativamente se produce en la raíz de la planta transgénica en condiciones de estrés osmótico. Uno o más fragmentos (por ejemplo, CAACGG (SEQ ID NO:2), GGACACGTGAC (SEQ ID NO:3), CAACAG (SEQ ID NO:4), CAACTT (SEQ ID NO:5) y TCTCTCTCTCTCTCTC TCTCTCTCACTCACTTCCTCTT (SEQ ID NO:6)) del promotor btg-26 se pueden unir operativamente al gen deseado y dirigir la expresión específica del gen deseado.

B. Genes deseados

Un gen deseado de la invención puede ser cualquier gen que se expresa deseablemente de una manera histoespecífica en una planta. Las clases generales de genes deseados que se pueden emplear ventajosamente en los métodos y las construcciones de la invención incluyen los genes que codifican proteínas estructurales de las plantas, genes que codifican proteínas implicadas en el transporte y/o la captación de los nutrientes, genes que codifican enzimas y proteínas implicadas en la utilización de los nutrientes, genes que codifican proteínas implicadas en la resistencia de la planta a los plaguicidas o los herbicidas, genes que codifican proteínas implicadas en la resistencia de la planta a los nematodos, virus, insectos o bacterias, genes que codifican proteínas implicadas en la resistencia de la planta al estrés (por ejemplo, estrés osmótico, por la temperatura, por el pH o por el oxígeno), genes que codifican proteínas implicadas en la estimulación o la continuación del crecimiento de la planta, genes que codifican proteínas implicadas en la fitorremediación o genes que codifican proteínas que tienen propiedades farmacéuticas o que codifican enzimas que producen compuestos que tienen propiedades farmacéuticas. Además, el gen deseado puede o no ser un gen en absoluto sino más bien una secuencia genética que, al transcribirse, es antisentido a una secuencia nativa, cuya transcripción y traducción se desea suprimir.

En una realización, los genes de interés son los que codifican enzimas de la asimilación y/o el metabolismo del nitrógeno y, en particular, los que asimilan amoníaco a aminoácidos o los que utilizan los aminoácidos formados en reacciones biosintéticas. Estas enzimas incluyen, pero sin limitarse a ellas, alanina deshidrogenasa, glutamina sintetasa (GS), asparragina sintetasa (AS), glutamato sintasa (también conocida como glutamato 2-oxoglutarato aminotransferasa y GOGAT), asparraginasa (ANS), glutamato deshidrogenasa (GDH), aspartato aminotransferasa (AspAT) (las actividades se muestran en la Figura 1) y alanina aminotransferasa (AlaAT) (la actividad se muestra en la Figura 2).

El gen deseado puede ser un gen expresado de forma natural en la planta seleccionada, o puede ser heterólogo a la planta seleccionada. El gen se puede originar a partir de cualquier fuente, incluidas las fuentes vírica, bacteriana, vegetal o animal. Preferiblemente, el gen es heterólogo al promotor al que se une, dado que no se une al promotor inducible sin modificar al que se une el gen de forma natural.

El gen deseado se puede modificar de cualquier manera para construir un gen o una planta con propiedades deseables. En una realización, se modifica el gen para que se pueda transcribir y traducir en un sistema vegetal; por ejemplo, se puede modificar el gen de tal forma que contenga todas las secuencias necesarias para la poliadenilación, sitios de iniciación y sitios de terminación que permiten que la secuencia codificante se transcriba a ARNm (ácido ribonucleico mensajero) y que el ARNm se transcriba en el sistema vegetal seleccionado. Además, se puede modificar el gen deseado de tal forma que su uso de codones sea más similar al de los genes nativos de la planta seleccionada. Tales modificaciones del gen deseado y los métodos mediante los cuales se pueden realizar éstas se conocen bien en la técnica.

C. Vectores

Las construcciones del gen deseado con el promotor histoespecífico se introducen de manera más eficaz en una célula vegetal o protoplasto vegetal mediante el uso de un vector. Ejemplos de vectores de clonación o de expresión adecuados a utilizar con la invención son plásmidos, cósmidos, ADN o ARN vírico y minicromosomas. Los vectores de plantas adecuados se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Clark, M., ed. (1997) *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*. Springer Verlag, ISBN: 3540584056).

Los vectores pueden contener ventajosamente uno o más marcadores de selección o de detección que se pueden expresar en plantas o bacterias, de tal forma que se pueda monitorizar la incorporación del vector en una célula o protoplasto vegetal. Es preferible que tales marcadores de selección o de detección confieran un fenotipo fácilmente detectable, tal como la resistencia a un compuesto que de otro modo sería tóxico (por ejemplo, resistencia a la kanamicina) o una reacción colorimétrica o luminiscente después de la incubación de la planta con un sustrato adecuado [por ejemplo, los genes de la α -glucuronidasa (GUS) o de la luciferasa]. Tales genes marcadores se conocen bien en la técnica.

Tanto el promotor histoespecífico como el gen deseado se pueden incorporar en un vector e introducirlos en una planta seleccionada. Las secuencias flanqueantes en 5' y 3' homólogas a las secuencias genéticas anteriores y posteriores a la localización en el genoma de la planta en las que se desea la recombinación de la secuencia del promotor introducido o del gen pueden rodear el promotor o el gen deseado en el vector, de tal forma que la recombinación homóloga se produce después de la introducción del vector en la célula vegetal o protoplasto. Mediante esta recombinación homóloga, se pueden producir plantas que tengan un gen deseado heterólogo bajo el control de un promotor histoespecífico nativo, o un promotor histoespecífico unido operativamente a un gen deseado nativo.

D. Transformación de las células vegetales

La construcción del gen se puede introducir en una célula vegetal mediante cualquier método útil. Se dispone de una gran cantidad de procedimientos, y se los conoce bien, para introducir genes en las células vegetales. Uno de los métodos mejor conocidos implica el uso de *Agrobacterium* o de bacterias similares del suelo como un vector. Los tejidos de destino se cocultivan con *Agrobacterium*, que inserta el gen de interés en el genoma de la planta, tal y como se describe en la Patente de EE.UU. 4.940.838 (Schilperoort *et al.*) y en Horsch *et al.*, 1985, *Science* 227: 1229-1231. Los métodos de transferencia y transformación génica alternativos útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, liposomas, electroporación o captación de ADN libre mediada por sustancias químicas, técnicas de coprecipitación con fosfato de calcio, microproyectiles dirigidos y micro- o macroinyección. Tales métodos de transformación se documentan bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley: Nueva York, y las referencias contenidas en éste. El experto en la técnica comprenderá que el método elegido para la transformación de la célula o protoplasto vegetal estará determinado, en gran parte, por la naturaleza de la construcción del gen deseado con el promotor histoespecífico y/o el vector que la contiene.

Plantas

Los métodos y las construcciones genéticas descritos en la presente memoria se pueden utilizar para producir una planta de cualquier especie capaz de utilizar el promotor de tal manera que la planta transgénica tenga la expresión histoespecífica de uno o más genes deseados. Tanto las plantas monocotiledóneas como las dicotiledóneas son adecuadas para tal alteración. Se pretende que la invención sea particularmente aplicable a, por ejemplo, plantas de cultivo (especialmente las del género *Brassica*), plantas ornamentales y árboles (particularmente, coníferas y el gen *Populus*). Las plantas particularmente adecuadas para la práctica de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellas,

canola, cebada, maíz, arroz, tabaco, soja, algodón, alfalfa, tomate, trigo, patata, chopo temblón, chopo de Virginia, coníferas y chopos.

Las plantas transgénicas y las semillas producidas según la presente invención pueden ser útiles además en los programas de cría para producir especies vegetales que tienen más de un rasgo deseado (por ejemplo, dos plantas transgénicas de la invención que tienen cada una de ellas la expresión de un transgén deseado en tejidos vegetales diferentes se pueden cruzar para dar lugar a una progenie de plantas transgénicas que tiene la expresión histoespecífica de ambos transgenes; o dos plantas transgénicas de la invención que tienen cada una de ellas la expresión de un transgén deseado diferente en el mismo tejido vegetal se pueden cruzar para dar lugar a una progenie de plantas transgénicas que tienen expresión histoespecífica para ambos transgenes). De esta forma, es posible producir plantas transgénicas que tienen una combinación de rasgos deseables en tejido(s) determinado(s) de la planta.

Además, el experto en la técnica comprenderá que diferentes especies de plantas pueden ser más o menos adecuadas para la manipulación genética en general y que, por lo tanto, puede ser ventajoso transformar primero una especie relacionada de la planta deseada mediante los métodos de la invención y con las construcciones descritas en la presente memoria y, posteriormente, introducir la expresión histoespecífica del gen deseado en la especie de la planta deseada mediante técnicas de hibridación genética. Tales técnicas y las especies de plantas apropiadamente relacionadas las conoce bien el experto en la técnica.

Las células o los protoplastos vegetales que se han transformado con la construcción del gen descrita en la presente memoria se pueden regenerar en plantas diferenciadas utilizando medios con nutrientes estándares complementados con la hormona inductora de brotes o la hormona inductora de raíces, utilizando métodos conocidos por el experto en la técnica (véase, por ejemplo, Shahin, E. A., Patente de EE.UU. 4.634.674 y referencias en ésta). Adicionalmente, se pueden recoger semillas de tales plantas transgénicas utilizando los métodos bien conocidos en la técnica y utilizarlas además para volver a cultivar plantas transgénicas e híbridos.

Usos de la invención

Los métodos de la invención permiten producir plantas y semillas que tienen la expresión de uno o más genes deseados en un tejido determinado de la planta. Así, los métodos de la invención permiten producir plantas que tienen uno o más rasgos deseados limitados a determinados tejidos de la planta, por lo que permiten enviar un rasgo al tejido, o evitar la expresión de un gen deseable en un tejido donde no se desean sus efectos. Hay una gran variedad de aplicaciones específicas de la invención, incluidas, pero sin limitarse a ellas, la producción de plantas que tienen aumentada la tolerancia al estrés, que tienen aumentada la resistencia a los herbicidas o plaguicidas, que tienen mejorada la captación y/o la utilización de nutrientes, que tienen mejorado el contenido de nutrientes y/o producción de los compuestos deseados, que tienen aumentada la resistencia a las plagas o enfermedades y que tienen propiedades fitorremediadoras. Aplicaciones específicas de la invención se describen con más detalle más adelante.

Las condiciones ambientales extremas, incluidas el estrés por sequía, el estrés salino, el estrés por luz, el estrés por pH, el estrés por temperatura y el estrés por oxígeno, tienen un impacto significativo en la capacidad de las plantas para crecer y florecer. Muchos suelos no permiten el crecimiento de las plantas deseadas debido a uno o más de los estreses ambientales antes mencionados. Mediante los métodos de la invención, es posible producir plantas y semillas que tienen una mejor tolerancia a tales condiciones extremas, por lo que permite el crecimiento en entornos que normalmente no permitirían el crecimiento de la planta. Por ejemplo, utilizando un promotor vegetal específico de raíces, es posible producir plantas que tienen moléculas transportadoras adicionales para mejorar la captación del agua del suelo circundante, por lo que se mejora el crecimiento de la planta en condiciones de sequía. De forma similar, la combinación de un promotor específico de raíz y genes que codifican moléculas transportadoras puede mejorar la secreción de sales o compuestos alcalinos o ácidos al suelo que rodea a la planta, por lo que se permite el crecimiento en estrés salino o en un suelo alcalino o ácido. El uso de promotores específicos de hoja en combinación con genes modificados del aparato fotosintético puede permitir la producción de plantas capaces de fotosintetizar en diferentes condiciones de luz, por lo que se alivia el estrés por luz.

Las plantas están expuestas a muchas plagas, entre ellas, insectos, nematodos, hongos, bacterias o virus. Los suelos infestados con una de las enfermedades o plagas anteriores tradicionalmente no han podido soportar el crecimiento de cultivos valiosos y plantas deseadas. Además, el tratamiento de tales enfermedades o la retirada de tales plagas ha requerido medidas tales como la aplicación de plaguicidas, que pueden ser perjudiciales para el crecimiento de la planta así como perjudiciales para el entorno circundante o para el usuario final de la planta. Con los métodos de la invención, es posible producir plantas que expresan genes de resistencia a plagas y enfermedades donde son más necesarios para defender la planta del ataque de enfermedades y plagas. Por ejemplo, al modificar genéticamente una planta con una construcción que combina un promotor histoespecífico y uno o más genes estructurales deseados, es posible proteger uno o más tejidos de la planta frente al consumo o al ataque de un insecto (por ejemplo, reforzando las paredes celulares de las células epiteliales en la hoja, raíz o tallo de tal forma que los insectos que destruyen hojas, raíces o el tallo ya no son capaces de dañar o alimentarse de estos tejidos). Además, es posible, utilizando los métodos de invención, expresar específicamente proteínas de inmunidad vegetal (por ejemplo, los genes N, M, L6, RPP1 y RPP5 de las monocotiledóneas, y los genes RPS2, RPMI, 12, Mi, Dm3, Pi-B, Xai, RPP8, RPS5 de las monocotiledóneas y las dicotiledóneas (véase, por ejemplo, Meyers *et al.*, (1999) *Plant J*: 20 (3): 317-332) en tejidos invadidos normalmente por bacterias y/o virus (raíces).

Aparte de la expresión protectora o profiláctica antes mencionada de las proteínas estructurales o inmunitarias en tejidos deseados específicos de la planta, también es posible expresar compuestos y proteínas que erradican de manera activa los insectos y otras plagas de la planta. Por ejemplo, compuestos tóxicos tales como las toxinas bacterianas o las enzimas que se dirigen específicamente contra las proteínas de insectos o constituyentes membranares de patógenos de la planta {por ejemplo, la delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* [Parker y Luttrell (1999), *J. Econ. Entomol.* 92 (4): 837-845] y la quitinasa (Ding *et al.*, (1998) *Transgenic Research* 7(2): 77-84) se pueden expresar en las raíces, tallos o la hojas de una planta para actuar selectivamente sobre una plaga conocida por atacar la planta en uno de estos tejidos. Simultáneamente, se evita la expresión del compuesto tóxico seleccionado en otros tejidos, tales como el fruto o la flor de la planta, por lo que se limita la exposición del consumidor final de la planta a la sustancia química o la proteína. Además, la capacidad para modificar genéticamente las defensas histoespecíficas y resistencias activas a plagas y microbios proporcionada por la presente invención ofrece la posibilidad de reducir la necesidad del uso de plaguicidas en el control de plagas y enfermedades, lo que da lugar a menos contaminación del entorno y a menos efectos secundarios indeseados en otras especies de plantas y animales.

Otra aplicación de la invención se encuentra en la producción de plantas que son capaces de florecer mejor en suelos con pocos nutrientes. Se conoce bien en la técnica que algunas especies de plantas, particularmente las plantas de cultivo, agotan los nutrientes del suelo necesarios para sostener el crecimiento, tales como el nitrógeno, el fósforo y el potasio. Para reponer la carencia de nutrientes, es necesario tanto fertilizar el suelo (un procedimiento caro y que daña el entorno) como cultivar las plantas que se sabe que depositan el nutriente agotado en el suelo (por ejemplo, el trébol o la soja en el caso de agotamiento de nitrógeno), que pueden ser cultivos económica o nutritivamente menos deseables. Los métodos de la invención permiten la expresión selectiva en la raíz de los genes que intervienen en la captación de nutrientes (por ejemplo, moléculas transportadoras) a esos tejidos en los que se produce la captación, por lo que se mejora la capacidad de la planta para absorber el nutriente del entorno. La invención también se puede utilizar para producir plantas que expresan genes heterólogos o genes nativos optimizados para la utilización de los nutrientes en la raíz que permiten el uso más eficaz del nutriente, de tal forma que se requieren menos nutrientes para el crecimiento y el funcionamiento normales de la planta. Además, es posible, utilizando los métodos de la invención, expresar en la raíz los genes implicados en la utilización y la captación de nutrientes que la planta no utiliza normalmente en los tejidos de la planta que se exponen directamente a nutrientes diferentes. De este modo, se pueden producir plantas que son capaces de crecer y florecer en fuentes diferentes de nutrientes (por ejemplo, fuentes diferentes de nitrógeno). Los genes deseados particularmente útiles para la optimización de la eficacia del nitrógeno de la planta incluyen: glutamina sintetasa (GS), asparagina sintetasa (AS), glutamato sintasa (también conocida como glutamato 2-oxoglutarato aminotransferasa y GOGAT), asparaginasa (ANS), glutamato deshidrogenasa (GDH), alanina deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa (AspAT) (las actividades se muestran en la Figura 1) y alanina aminotransferasa (AlaAT) (la actividad se muestra en la Figura 2).

Además, los métodos de la invención permiten producir plantas con un contenido nutritivo alterado (por ejemplo, contenido de proteínas, contenido de azúcar, contenido de vitaminas o minerales, contenido de aceite, contenido de lípidos, contenido de glúcidos, contenido de almidón), o sustancias fitoquímicas (por ejemplo, compuestos vegetales bioactivos tales como esteroides, compuestos contra el cáncer, estimulantes, compuestos psicoactivos u otros compuestos que tienen propiedades farmacéuticas) en la raíz. La expresión selectiva de una proteína de síntesis de vitaminas en el tejido del tubérculo o del fruto puede dar lugar a frutos o tubérculos con un aumento del contenido de vitaminas. De forma similar, la expresión selectiva de las enzimas implicadas en la producción de azúcares en el tubérculo o el fruto puede aumentar la dulzura de estos tejidos, lo que los hace más atractivos para el consumo, o el aumento del valor nutritivo del tejido. De forma similar, para las plantas de las que se extrae uno o más compuestos deseados, que son capaces de aumentar la producción del compuesto deseado [por ejemplo, un azúcar (como la caña de azúcar) u otro compuesto deseado de la planta (tal como el cacao o compuestos vegetales con propiedades farmacéuticas)] en los tejidos de la planta de los que se extrae fácilmente el compuesto (por ejemplo, el tejido foliar o el tejido radical) puede aumentar la producción del compuesto deseado de la planta.

Otra aplicación de la invención se encuentra en la producción de plantas que son resistentes a los herbicidas y/o los plaguicidas. Tanto los herbicidas como los plaguicidas se utilizan habitualmente para permitir el crecimiento y el desarrollo continuo de las plantas en condiciones de infestación por plagas u otras plantas. Al producir una planta que expresa específicamente una proteína que es capaz de detoxificar el herbicida o el plaguicida (por ejemplo, una molécula transportadora que permite la excreción específica del herbicida o el plaguicida, o una enzima que convierte el herbicida o el plaguicida en un compuesto inocuo) en los tejidos de plantas con la mayor exposición al compuesto (por ejemplo, la raíz de la planta), es posible producir plantas que son resistentes a los efectos del plaguicida o el herbicida.

La invención permite además la producción de plantas que pueden detoxificar los compuestos no deseados (por ejemplo, restos de hidrocarburos o de metales pesados) en el entorno (por ejemplo, en el suelo, agua o aire) y, así, son útiles para la fitorremediación. Por ejemplo, las plantas transgénicas que expresaran una proteína que es capaz de quelar metales pesados o de convertir enzimáticamente un compuesto potencialmente perjudicial (por ejemplo, un hidrocarburo tal como el petróleo o el benceno) a un producto de degradación más benigno serían útiles y rentables en el esfuerzo por limpiar sitios de desechos peligrosos.

La invención permite además el uso de plantas en la producción de sustancias químicas o proteínas deseables. En muchos casos, la síntesis de una sustancia química o proteína deseada no es factible con facilidad y el aislamiento del compuesto de las fuentes naturales es un procedimiento caro, poco manejable y que requiere mucho tiempo. Utilizando

los métodos de la invención, es posible modificar genéticamente una planta determinada de tal forma que la planta exprese uno o más genes determinados (por ejemplo, genes en los que el producto de la expresión es deseable, o genes que codifican enzimas que están implicadas en la producción del compuesto deseado) en la raíz (por ejemplo, los tejidos vegetales a partir de los cuales es más fácil la extracción y la posterior purificación del compuesto). Ejemplos de compuestos que se pueden producir ventajosamente mediante la aplicación de los métodos y de las composiciones de la invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, vitaminas, enzimas, aminoácidos, azúcares, lípidos, glúcidos y compuestos que tienen propiedades farmacéuticas, tales como estimulantes, compuestos contra el cáncer y similares.

La inhibición selectiva de la expresión del gen en uno o más tejidos vegetales determinados se puede conseguir mediante el uso de secuencias de ácidos nucleicos antisentido. El experto en la técnica conoce bien la tecnología de los ácidos nucleicos antisentido; para una discusión general de la tecnología antisentido en las plantas, véase, por ejemplo, Shewmaker *et al.*, Patente de EE.UU. 5.453.566. Las secuencias de ácido nucleico cuyos productos de transcripción son ARNm antisentido para un gen o genes deseado(s) se pueden expresar solamente en los tejidos vegetales en los que no se desea la expresión del gen o los genes deseado(s). Después de la transcripción del ácido nucleico introducido en los tejidos seleccionados, el ARNm antisentido resultante se hibrida al ARNm del (de los) gen(es) deseado(s), por lo que se evita que se traduzca el ARNm del gen deseado. Esto puede ser útil, por ejemplo, para alterar estructuralmente determinados tejidos de la planta, de tal forma que las sustancias químicas tales como los plaguicidas sean tomados más fácilmente por la planta, o para alterar las propiedades nutritivas de la planta, por ejemplo, inhibiendo la expresión de uno o más compuestos tóxicos en el fruto de la planta. Otras aplicaciones útiles serán evidentes para el experto en la técnica.

Las construcciones genéticas descritas en la presente memoria también pueden proporcionar plantas transformadas que pueden expresar un gen deseado cuando es más necesario o beneficioso. Dado que el promotor de *btg-26* de *Brassica napus*, tal y como se describe en el Ejemplo 1 y se muestra en la Figura 3 y en la SEQ ID NO:1, es inducible por estrés, cuando el gen deseado es el gen de la asimilación y/o utilización del nitrógeno, se induce la planta para que asimile y/o metabolice nitrógeno después de la aplicación del estrés. Por lo tanto, tal planta puede tener un aumento de la tolerancia al estrés, tal como mediante la mejora de la osmorregulación. Otras aplicaciones serán fácilmente evidentes para el experto en la técnica.

Como otro ejemplo, cuando el promotor es inducido por la presencia de nitrato, tal como, por ejemplo, el promotor de la nitrato reductasa (Cheng *et al.*, 1988, *ibidem*; Cheng *et al.*, 1991, *Plant. Physiol.* 96: 275-279), se inducirá la planta para que asimile y/o utilice el nitrógeno después de la aplicación de un fertilizante nitrogenado. Alternativamente, o adicionalmente, se puede inducir el promotor, por ejemplo, mediante una sustancia química aplicada exógenamente tal como alcohol o ABA (véase, por ejemplo, Marcotte *et al.*, 1989, *Plant Cell* 1: 969-976). Esta sustancia química se podría incluir en un fertilizante nitrogenado. Así, las plantas pueden utilizar de manera más eficaz la entrada de fertilizante al tomar rápidamente el nitrógeno en el fertilizante y guardándolo durante la aplicación, para reducir así las cantidades de fertilizante nitrogenado que se pierden por la lixiviación, etc. Esto puede permitir una reducción en la cantidad de fertilizante nitrogenado requerido a aplicar a un cultivo, para obtener rendimientos de cultivo comparables a los obtenidos utilizando técnicas de cultivo normales y plantas que no se han modificado según la presente invención. Ventajas agronómicas adicionales pueden incluir un crecimiento más rápido y un mayor rendimiento del cultivo, donde se mantiene el aporte de fertilizante nitrogenado en los niveles utilizados en las técnicas de cultivo de las cosechas comunes.

Las plantas de *Brassica napus* transformadas que expresan ectópicamente un gen que codifica una enzima que interviene en la asimilación o el metabolismo del nitrógeno, por ejemplo, pero sin limitarse a ellas, alanina deshidrogenasa, glutamina sintetasa, asparragina sintetasa, glutamato sintasa, asparragina, glutamato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa (Figuras 1 y 2) se cultivaron en condiciones de campo (Ejemplo 6) para determinar si se conservarían los efectos beneficiosos sobre el crecimiento y el rendimiento de la planta en condiciones de crecimiento controladas (Ejemplos 3 y 4). Por ejemplo, se examinó si la cantidad de nitrógeno disponible tendría un efecto sobre la biomasa vegetal y la producción de semillas en las plantas que expresan *btg-26/AlaAT* cultivadas en condiciones de campo. Sin embargo, se debe comprender que las plantas cultivadas en condiciones de campo están sometidas a un intervalo de condiciones medioambientales adversas que incluyen el estrés por salinidad, el estrés por temperatura, el estrés por nutrientes, el estrés por pH, el estrés por sequía, el estrés por metales pesados y similares, y mientras que las cantidades de nitrógeno pueden variar, estas plantas también se expondrán a otras condiciones extremas del entorno.

Tal y como se puede ver con referencia a la Figura 19A, las plantas transgénicas que expresan un gen que codifica una enzima que interviene en la asimilación o el metabolismo del nitrógeno, por ejemplo, pero sin limitarse a la *AlaAT* (plantas 53F y 81B), mostraron un rendimiento similar en biomasa vegetal independientemente de la disponibilidad de nitrógeno. Sin embargo, las plantas de control mostraron un menor rendimiento en condiciones con poco nitrógeno. Además, la biomasa vegetal observada en las plantas transgénicas en presencia (“alta”) o en ausencia (“baja”) de N adicional, fue equivalente a la de las plantas de control que recibieron N (“alto”). Estos resultados muestran que la expresión ectópica de un gen que codifica una enzima que interviene en la asimilación o el metabolismo del nitrógeno da lugar a un aumento de la biomasa vegetal en un margen de condiciones del entorno que incluyen la disponibilidad variable de nitrógeno. En ausencia de cualquier nitrógeno añadido, las plantas transgénicas produjeron mayores rendimientos que las plantas de control, lo que indica que las plantas transgénicas fueron capaces de crecer mejor en condiciones medioambientalmente adversas.

Por lo tanto, un método para aumentar la biomasa de una planta que crece en una o más condiciones medioambientalmente adversas, tales como condiciones con poco nitrógeno, puede comprender:

transformar una planta con un gen deseado unido operativamente con un elemento de promotor para producir una planta transformada, codificando el gen deseado una enzima que interviene en la asimilación del nitrógeno; y hacer crecer la planta transformada.

Se examinó la producción de semillas en plantas de control y transgénicas cultivadas en condiciones de campo (Figura 19B). Las plantas de control generaron mayores producciones de semillas cuando se complementaron con nitrógeno adicional. Sin embargo, las plantas transgénicas que expresan un gen que codifica una enzima que interviene en la asimilación o el metabolismo del nitrógeno mostraron mayores rendimientos que las plantas de control en presencia o en ausencia de N adicional. También se muestra en la Figura 19B que los rendimientos observados con las plantas transgénicas fueron equivalentes en las plantas cultivadas con mucho o poco nitrógeno. En conjunto, estos resultados indican que las plantas transgénicas que expresan ectópicamente una enzima que interviene en la asimilación o el metabolismo del nitrógeno son capaces de optimizar la utilización del nitrógeno disponible en un margen de condiciones medioambientales, por lo que dan lugar a un aumento de la biomasa vegetal, de la producción de semillas o una combinación de éstas.

Por lo tanto, un método para aumentar la producción de semillas de una planta puede comprender:

transformar la planta con un gen deseado unido operativamente a un elemento promotor para producir una planta transformada, codificando el gen deseado una enzima que interviene en la asimilación o el metabolismo del nitrógeno; y hacer crecer la planta transformada.

La descripción anterior no pretende limitar la invención reivindicada de ninguna manera; además, la combinación de características descrita podría no ser absolutamente necesaria para la solución inventiva.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes Ejemplos. Sin embargo, se debe entender que estos Ejemplos tienen solamente propósitos ilustrativos y no se deben utilizar para limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1

Aislamiento y caracterización de un promotor inducido por estrés osmótico

Una genoteca de ADN genómico de *Brassica napus* (cv. *Bridger*) (Clontech, Palo Alto, California) se cribó utilizando técnicas estándares (Ausubel *et al.*, 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, Wiley: Nueva York) con el clon de ADNc (ácido desoxirribonucleico complementario) 26g de *Pisum sativum* (Guerrero *et al.*, *ibídem*), se marcó con ³²P con un Random Primer Kit (Boehringer Mannheim, Laval, Quebec). Un fragmento *Sall* de 4,4 kb que contiene todo el gen *btg-26* se subclonó en el vector disponible comercialmente pT7T3-19U (Pharmacia Canada, Inc., Baie d'Urfe, Quebec, Canadá) para el análisis posterior.

Identificación de un promotor inducido por estrés osmótico en Brassica napus

Varios genes activados durante el estrés por sequía se han aislado y caracterizado a partir de diferentes especies de plantas. La mayoría de ellos representan genes inducibles por ABA de respuesta tardía (revisado de Skiver y Mundy, *ibídem*). Sin embargo, se ha descrito recientemente un transcrito independiente de la cicloheximida e independiente del ABA, el 26g, en *Pisum sativum* (Guerrero y Mullet, *ibídem*; Guerrero *et al.*, *ibídem*). Dado que este gen no requiere la síntesis de proteínas para la activación, se postula que representa un factor temprano en la vía de transducción de la señal de la sequía. Para aislar un promotor inducido por el estrés osmótico de *Brassica napus*, se utilizó el clon del ADNc que representa el gen 26g de *P. sativum* (Guerrero *et al.*, *ibídem*). Se aisló el ARN total de la tercera hoja de plantas enteras que se habían regado continuamente o bien que se habían deshidratado durante cuatro días. Utilizando una hibridación poco rigurosa, el análisis de transferencia del ARN identificó un único transcrito de 1,75 kb que se induce mucho en las plantas en sequía (datos sin mostrar). Para determinar si este ARNm representa un gen de una sola copia en *B. napus*, se digirió el ADN genómico con *EcoRI*, *HindIII* o *BglIII* y se analizó mediante la hibridación del ADN transferido utilizando el ADNc del 26g de *P. sativum*. Se identificó una sola banda en cada carril (datos sin mostrar). Se llegó a la conclusión de que este transcrito representa un gen inducido por sequía de una sola copia en *B. napus*. Este gen se denominó *btg-26* (gen-26 de la urgencia de *Brassica*).

*Estructura del gen *btg-26**

Para aislar el gen *btg-26*, se cribó una genoteca de ADN genómico de *B. napus* en EMBL-3 (Clontech, Palo Alto, California) con el ADNc del 26g de *P. sativum*. De las 40.000 calvas analizadas, se identificó un solo clon positivo con un tamaño del inserto de unas 16 kb. Se subclonó un fragmento *Sall* de 4,4 kb que contenía todo el gen. Se determinó la secuencia del promotor del gen *btg-26* mediante la identificación del sitio de iniciación del ARNm mediante la extensión de cebadores (Ausubel, *ibídem*) y se muestra en la Figura 3 y en la SEQ ID NO:1. En la Figura 3, el sitio

de iniciación de la transcripción está en **negrita**, subrayado y señalado con +1. La caja TATA y la caja CAAT están en **negrita** y con doble subrayado. Las regiones funcionales postuladas están subrayadas. La secuencia del promotor del *btg-26*, la región codificante y la región 3' se han presentado en Stroehrer *et al.*, (1995, *Plant. Mol. Biol.* 27: 541-551).

5 *Análisis de expresión de btg-26*

La inducción de la expresión de *btg-26* durante la sequía se examinó mediante el análisis de transferencia de ARN. Las plantas de *B. napus* en macetas se deshidrataron de forma natural deteniendo el suministro de agua durante distintos periodos de tiempo. Se utilizaron hojas enteras, tanto para determinar el contenido relativo de agua (CRA) de cada planta por separado como para aislar el ARN total. Tal y como se muestra en las Figuras 4A y 4B, la expresión de *btg-26* se induce rápidamente durante la pérdida de agua, alcanzando un aumento de seis veces sobre la expresión en las plantas totalmente hidratadas con un CRA del 81%, aumentando once veces la inducción con un CRA del 63%. Las disminuciones adicionales del CRA se asociaron a una disminución en la cantidad total del transcrito de *btg-26*. A un CRA del 30%, la expresión fue sólo de 3,5 veces sobre niveles en total hidratación.

Debido a que otros estreses fisiológicos alteran el contenido de agua intracelular, se examinó la expresión de *btg-26* en las plantas de *B. napus* expuestas al estrés por frío, por temperaturas elevadas y por sales. El análisis de transferencia de ARN indicó que no hubo ningún cambio en la expresión del *btg-26* cuando se transfirieron las plantas de unas condiciones de crecimiento normales a 4°C durante un día. Sin embargo, las plantas que permanecieron a 4°C durante cuatro días mostraron una inducción de cinco veces del ARNm de *btg-26*. Se observó un aumento similar cuando se cambiaron las plantas a 40°C durante dos o cuatro horas. Estos resultados se muestran en la Figura 4C y demuestran que la expresión del *btg-26* se induce durante el estrés por temperatura. Para examinar el efecto del estrés salino, se regaron las plantas al máximo durante un día o cuatro días con NaCl a 50 mM, 150 mM o 450 mM. El nivel de expresión de *btg-26* no resultó afectado por el NaCl a 50 mM independientemente de la duración de la exposición. Sin embargo, el crecimiento en NaCl a 150 mM causó un aumento de dos veces del ARNm de *btg-26* después de cuatro días. La exposición a NaCl a 450 mM causó la inducción más notable, doce veces después de un día, que cayó hasta cuatro veces después de cuatro días. Véase la Figura 4D para las transferencias Northern que muestran estos resultados.

Finalmente, muchos genes inducibles por sequía también responden al ABA. Para examinar la función del ABA en la expresión de *btg-26*, se aisló el ARN total de distintas hojas tratadas con o sin ABA. En estos experimentos, se cortaron las hojas por el pecíolo y se colocaron en una disolución de ABA a 0 µM, 50 µM o 100 µM (isómeros mezclados, Sigma), Tween-20 al 0,02% y pH 5,5 durante 24 horas. Tal y como se muestra en la figura 4E, la expresión de *btg-26* se induce 2,5 veces cuando se expone al ABA a 100 µM. Sin embargo, cuando se expusieron las hojas al ABA a 50 µM, no se observó ninguna inducción de la expresión (datos no mostrados). Estos resultados indican que *btg-26* responde al ABA, pero que este nivel de respuesta depende de la concentración.

Ejemplo 2

40 *Creación de construcciones de asimilación del nitrógeno inducida por sequía*

Esta etapa incluyó la producción de construcciones de AlaAT constitutivas o inducidas por la sequía y su introducción en *Brassica napus* utilizando la transformación genética mediada por *Agrobacterium*. El método de introducir construcciones de ADNc sentido o antisentido específicas en las plantas para modificar vías metabólicas específicas se ha utilizado en una serie de especies y para modificar una serie de vías diferentes (Véase Stitt y Sonnewald, 1995, para una revisión; *Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 46: 341-368). Se introdujo el ADNc de AlaAT bajo el control de tres promotores diferentes: 1) el promotor del CaMV que se ha demostrado que es un promotor constitutivo fuerte en una serie de especies vegetales diferentes; 2) el promotor de *btg-26* descrito en el Ejemplo 1 y 3) el promotor de *trg-31* que ha sido aislado del tabaco por Guerrero y Crossland (*ibídem*). El promotor del CaMV debe dar lugar a una sobreexpresión constitutiva de la AlaAT mientras que *btg-26* y *trg31* deben inducir la sobreexpresión de la AlaAT solamente en condiciones extremas específicas, que incluye el estrés por sequía.

Construcciones plasmídicas

El clon 3A del ADNc de la AlaAT de la cebada (tal y como se muestra en la Figura 5 y en Muench y Good, *ibídem*) se clonó en el vector pT7T3-19U (Pharmacia, Canadá) y se utilizó para la mutagénesis específica de sitio utilizando dos cebadores específicos. El cebador 1 introdujo un sitio de restricción *Bam*HI entre los nucleótidos 48 y 53, mientras que el cebador 2 se utilizó para introducir un segundo sitio de restricción *Bam*HI entre los nucleótidos 1558 y 1563 (véase la Figura 5). Luego, se clonó el fragmento de 1510 pb en el vector p25 (Figura 6) que se había cortado con *Bam*HI. p25 fue un obsequio del Doctor Maurice Moloney (Universidad de Calgary, Calgary, Alta, Canadá). Esta construcción contiene el promotor CaMV35S duplicado, que se ha demostrado que proporciona unos niveles constitutivos de expresión elevados, y se introdujo el terminador NOS en el sitio *Kpn*I y *Pst*I del pUC19 con un policonector *Bam*HI, *Xba*I y *Pvu*II entre la región de CaMV y de NOS del plásmido. El plásmido resultante se denominó pCa2/AlaAT/NOS, tal y como se muestra en la Figura 7A.

Se crearon los plásmidos pbtg-26/AlaAT/NOS como sigue. Se subclonó el promotor *trg-31* como un fragmento *Xba*I/*Bam*HI de 3,0 kb en el sitio *Xba*I/*Bam*HI del pCa2/AlaAT/NOS que se había digerido con *Xba*I/*Bam*HI para liberar solo el promotor del CaMV, lo que dio lugar a un fragmento promotor de 3 kb introducido

en frente de la región codificante de la AlaAT. Se creó btg-26/AlaAT/NOS introduciendo un sitio *Bam*HI en los nucleótidos +9 a +14 (véase la Figura 3) y subclonando el fragmento *Kpn*I/*Bam*HI de 330 pb (de -320 a +10 en la Figura 3) en el sitio *Kpn*I/*Bam*HI de pCa2/AlaAT/NOS que se había digerido para liberar el promotor del CaMV. Las construcciones plasmídicas pbtg-26/AlaAT/NOS y ptrg-31/AlaAT/NOS se pueden observar en las Figuras 7B y 7C, respectivamente.

Transformación y análisis de las plantas de Brassica napus con construcciones de la AlaAT

Una vez que se habían confirmado los tres plásmidos, tal y como se muestra en las Figuras 7A, 7B y 7C, que contienen el gen de la AlaAT, mediante análisis de restricción y secuenciación, se subclonaron en el vector de transformación pCGN1547 (Figura 8). El pCGN1547 es un vector binario de *Agrobacterium* desarrollado por McBride y Sunlmerfelt (1990, *Plant Mol. Biol.* 14: 269-276). El pCGN1547 contiene el gen de la neomicina fosfotransferasa II (NPTII) que codifica la resistencia a la kanamicina. Luego, se introdujeron estas construcciones en la cepa EHA101 de *Agrobacterium* mediante electroporación utilizando el protocolo de Moloney *et al.* (1989, *Plant Cell Reports* 8: 238-242). La confirmación de que *Agrobacterium* se había transformado con el vector pCGN1547 que contiene la construcción específica se confirmó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se produjeron plantas transgénicas utilizando el método de transformación de cotiledones tal y como se describe en Moloney *et al.* (*ibídem*). Las plántulas resistentes a la kanamicina se transfirieron al suelo y, luego, se hicieron crecer. La generación inicial, o transformantes primarios, se denominaron generación T0 y se autopolinizaron. Cada generación posterior se colocó en bolsas para asegurar la autopolinización y se denominaron generación T1, T2, respectivamente. Se comprobó la introducción de la construcción de *Agrobacterium* en las supuestas plantas transgénicas T0 utilizando cebadores de PCR que amplifican el gen de la NPTII y probando la actividad de la NPTII tal y como se describe en Moloney *et al.* (*ibídem*).

Análisis de las plantas de Brassica transformadas que contienen las construcciones de la AlaAT

Se analizó la actividad AlaAT en las plantas transgénicas de la siguiente forma. Se llevaron a cabo extracciones en hielo tal y como se describió previamente (Good y Crosby, 1989, *Plant Physiol.* 90: 1305-1309). Se pesó el tejido foliar y se molió con arena en un mortero con un tampón de extracción que contiene Tris-HCl a 0,1 M (pH 8,5), ditiotreitól a 10 mM, glicerol al 15% y PVPP al 10% (p/v). Se limpió el extracto mediante centrifugación a 6000 rpm y se analizó la actividad de la enzima en el sobrenadante. Se realizaron análisis de la AlaAT en la dirección de alanina a piruvato tal y como se describió previamente (Good y Crosby, *ibídem*) utilizando alanina para iniciar la reacción.

Después de la transformación, se produjeron 20 plantas Ca2/AlaAT/NOS, 24 plantas btg-26/AlaAT/NOS y 21 plantas trg-31/AlaAT/NOS que estaban transformadas, sobre la base de la amplificación de un producto de PCR de la NPTII y de la actividad de la NPT. Se midió la actividad AlaAT, utilizando el método descrito anteriormente, en el tejido foliar de varios de estos transformantes. Tal y como se puede observar en la Tabla 1, las plantas btg-26/AlaAT/NOS tenían unos niveles de actividad AlaAT que oscilaban de 1,63 veces a 3,89 veces los de las plantas de control de tipo salvaje. Las plantas Ca2/AlaAT/NOS tenían unos niveles de actividad que oscilaban de 1,51 veces a 2,95 veces los de las plantas de control de tipo salvaje. Los análisis de inmunotransferencia confirmaron que las plantas transgénicas tenían unos niveles elevados de AlaAT, sobre la base de la reactividad cruzada de una banda con el anticuerpo contra la AlaAT de la cebada (datos no mostrados).

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 1: actividad alanina aminotransferasa (AlaAT) en los transformantes primarios

Planta	Actividad*
Btg-26/AlaAT/NOS	
Transformante n° 4	3,89x
Transformante n° 5	1,63x
Transformante n° 7	1,93x
Transformante n° 8	1,98x
Transformante n° 18	1,63x
Ca2/AlaAT/NOS	
Transformante n° 1	1,51x
Transformante n° 2	2,77x
Transformante n° 6	1,61x
Transformante n° 7	2,95x
Transformante n° 9	2,14x
Transformante n° 12	1,91x
Transformante n° 13	1,77x
* La actividad enzimática se expresa respecto a los controles de tipo salvaje	

Ejemplo 3

Crecimiento de los transformantes primarios en condiciones normales

Las semillas de T1 de los transformantes primarios de los grupos CaMV/AlaAT y btg-26/AlaAT se hicieron crecer junto con plantas de tipo salvaje de control en condiciones normales que incluyen plantar a 1 cm de profundidad en macetas de plástico de 13 cm de diámetro que contienen un suelo y una mezcla de fertilizante tal y como se describe en Good y MacLagan (*ibidem*). Se colocaron estas macetas en cámaras de crecimiento en las condiciones siguientes: 1) 16 horas de 265 mmol m² s⁻¹ proporcionadas por tubos fluorescentes VITA-LITE U.H.O, 2) temperaturas diurnas y nocturnas de 21°C y 15°C, respectivamente, 3) humedad relativa del 85% al 97% y 4) riego diario con una disolución de Hoagland de fuerza 1/2. La única diferencia observable detectada entre las plantas fue que las plantas btg-26/AlaAT tenían unos tallos más gruesos en comparación con los controles y las plantas CaMV/AlaAT. No se observaron diferencias significativas entre los tres grupos en términos de velocidad de crecimiento, tamaño de las plantas o las hojas o senescencia foliar en momentos idénticos, tiempo para que madure, tamaño de las semillas, o rendimiento de las semillas.

Ejemplo 4

Crecimiento de los transformantes primarios en condiciones de carencia de nitrógeno/sequía

Las semillas de T1 de los transformantes primarios de los grupos CaMV/AlaAT y btg-26/AlaAT se hicieron crecer junto con plantas de control de tipo salvaje durante cuatro semanas en condiciones normales (tal como se señaló anteriormente) y, luego, se les suprimió el nitrógeno, regándolas sólo con agua durante 3 semanas, seguido por sequía durante 3 días. La Figura 9 muestra plantas representativas de los tres grupos después del tratamiento en momentos idénticos. La planta A es una planta de tipo salvaje de control; la planta B es una planta transformada con CaMV/AlaAT; y la planta C es una planta con btg-26/AlaAT. Se puede observar que la planta C (btg-26) claramente tiene una velocidad de crecimiento más rápida que las plantas A (control) y B (CaMV/AlaAT). Además, las plantas A y B presentan hojas senescentes (indicadas con flechas) mientras que la planta C no tiene hojas senescentes. En resumen, se observó lo siguiente en las plantas con btg-26/AlaAT tratadas al compararse con las plantas con CaMV/AlaAT tratadas y las plantas de control: velocidad de crecimiento más rápida; plantas más grandes en momentos similares; menos senescencia en las hojas inferiores; madurez más temprana; tallos más gruesos; mayores semillas y mayor producción de semillas.

Ejemplo 5

Expresión histoespecífica de los genes que utilizan el promotor de btg-26

- 5 Para determinar si los genes bajo el control regulador del promotor de *btg-26* se expresaban de una manera histoespecífica, se realizaron experimentos en los que los niveles del producto proteico expresado de un transgén colocado bajo el control del promotor de *btg-26* se midieron tanto en el brote como en la raíz de una planta transgénica que contiene la construcción de *btg-26*. Se utilizaron tanto un gen indicador (GUS) como un gen funcional de interés (AlaAT), y la expresión de los productos de sus respectivos productos proteicos tanto en el brote como en la raíz de las plantas transgénicas se determinó cualitativa y cuantitativamente.

Producción de las plantas transgénicas con btg-26/GUS

- 15 Se produjeron plantas que expresan el gen indicador GUS bajo el control regulador del promotor de *btg-26*. Primero, se creó un plásmido *btg-26/GUS* introduciendo un fragmento de 300 pb *KpnI/BamHI* del promotor de *btg-26* en el sitio *KpnI/BamHI* del pBI101 que se había digerido para liberar el promotor del CaMV. Luego, se subclonó este plásmido en el vector de transformación pCGN1547 que se introdujo en la cepa EHA101 de *Agrobacterium* mediante electroporación utilizando el protocolo de Moloney *et al.* (*ibídem*). La confirmación de que se habían transformado las plantas de *Brassica* se obtuvo mediante: a) amplificación por PCR del gen de la NPTII que codifica la neomici-
- 20 na fosfotransferasa y b) analizando la actividad de la NPTII tal y como se describió en Moloney *et al.* (*ibídem*). Se autofertilizaron las plantas transgénicas (T0) y, luego, se autofertilizaron las plantas T1 para producir semillas T2. Se comprobaron las semillas de T2 utilizando el análisis de resistencia a la kanamicina (Moloney *et al.*, 1989, *ibídem*) para asegurar que las semillas eran homocigóticas.

- 25 *Tinción in vivo de GUS en las estirpes transgénicas con btg-26/GUS*

- Para determinar la distribución hística de la expresión del gen GUS de la construcción *btg-26/GUS* dentro de las plantas transgénicas descritas en la sección anterior, se determinó la actividad GUS en diferentes tejidos mediante una reacción colorimétrica, cuyos resultados se pudieron evaluar visualmente. Las plantas se germinaron y se hicieron crecer hidropónicamente en condiciones estériles en medio Long Ashton modificados (Savidov *et al.*, 1998) en tarros Magenta, que se hicieron burbujear con aire. Se tiñeron plantas de cinco semanas para determinar la actividad GUS *in vivo* reemplazando los medios MS con un tampón de fosfato a 50 mM (pH 7,5) que contiene X-gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -glucurónico) a 0,2 mM e incubando las plantas en este medio durante 24 horas. Luego, se observó el tejido radical en un microscopio de disección con los aumentos indicados y se fotografiaron. Tal y como se muestra en la Figura 10, el promotor de *btg-26* dirige la expresión de un gen indicador (GUS) en los pelos radicales (panel B) y en una sola capa de células epidérmicas de las raíces (paneles C y D). Además, el promotor dirige la expresión en la punta de la raíz, el área de división celular y el área de expansión celular (paneles A-D).

- 40 *Tinción in vitro de GUS en las estirpes transgénicas con btg-26/GUS*

- El análisis de tinción descrito anteriormente permitió un análisis visual cualitativo del patrón de expresión de la construcción *btg-26/GUS* en diferentes tejidos de la planta transgénica. Para obtener un análisis cuantitativo de la distribución del tejido de la expresión dirigida por *btg-26*, también se midieron los niveles de la actividad GUS en diferentes tejidos de la planta transgénica. Se cultivaron las plantas tal y como se describió anteriormente (*Tinción in vivo de GUS en las estirpes transgénicas con btg-26/GUS*), y se recogió el tejido y se molió en un tampón de ensayo de GUS. Se midió la actividad de GUS *in vitro* tal y como se describió en Gallagher, S. R. (1992) *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. Academic Press: Nueva York, ISBN 0-12-274010-6. Tal y como se muestra en la Figura 11, el promotor de *btg-26* dirige la expresión de un gen indicador (GUS) en el tejido radical de una manera significativamente más fuerte que en el tejido de brote (hoja) (entre unas dos veces y unas 20 veces más fuertemente).

Expresión diferencial del transgén de la AlaAT en las raíces y las hojas de las estirpes transgénicas con btg-26/AlaAT

- 55 Para determinar si la construcción *btg-26/AlaAT* descrita previamente se expresa de una manera dependiente del tejido al igual que la de la construcción *btg-26/GUS*, se evaluó la expresión de la AlaAT en el tejido radical y foliar de las plantas transgénicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcriptasa inversa (RT-PCR). Esta metodología permite una detección sensible de la presencia del ARNm de la AlaAT y, junto con los métodos densitométricos, permite la cuantificación del producto traducido en un tejido determinado de la planta transgénica.

- 60 Se confirmó la expresión diferencial del transgén de la AlaAT en las raíces y hojas de las estirpes transgénicas con *btg-2/AlaAT* utilizando RT-PCR como en los protocolos moleculares normales. La Figura 12 es un análisis de transferencia Southern de los productos de la RT-PCR del ARN de hoja y de raíz. Se recogió tejido foliar de plantas de 5 semanas cultivadas tal y como se describió anteriormente (*Tinción in vivo de GUS en las estirpes transgénicas con btg-26/GUS*) mientras que se recogió tejido radical de las plantas cultivadas tal y como se describe más abajo (*Expresión diferencial del transgén de la AlaAT en el tejido radical de las estirpes transgénicas con btg-26/AlaAT*). Los cebadores amplificaron un producto de 381 pb en el extremo 5' del transgén de la AlaAT y un producto de 311 pb que no tenía homología con el ADNc de la AlaAT. A partir de la densitometría relativa del producto de 381 pb (se

indica debajo de cada carril en la Figura 12), es evidente que el promotor de *btg-26* dirige la expresión del transgén preferiblemente (expresión 1,25 a 2,8 veces mayor) en el tejido radical en las estirpes transgénicas que muestran el fenotipo de uso eficaz del N (y, por lo tanto, se sabe que expresan el producto proteico de la AlaAT).

Expresión diferencial del transgén de la AlaAT en el tejido radical de las estirpes transgénicas con *btg-26/AlaAT*

La confirmación visual de los resultados anteriores se logró mediante la inmunolocalización del producto proteico de la AlaAT en los tejidos radicales que contienen la construcción *btg-26/AlaAT*. Se hicieron crecer las plantas hidropónicamente en un medio Long Ashton modificado (Savidov *et al.*, 1998, *Plant Sci*, 133:33-45) en una cámara de crecimiento (18°C, 350 uE, 16 horas luz/8 horas). Se escindieron las raíces después de 5 semanas y se tiñeron con un anticuerpo contra la AlaAT. La tinción implicó incluir las raíces en parafina, seccionarlas con un microtomo y, luego, utilizar un anticuerpo específico contra la AlaAT [Muench, D. G y A. G. Good (1994) *Plant Mol. Biol.* 24: 417-427] y un anticuerpo secundario de cabra antirratón con peroxidasa como para los protocolos de inmunolocalización normales.

Específicamente, se fijaron los tejidos en FAA (etanol al 50%, ácido acético al 5%, formol al 10%), se deshidrataron el *terc*-butanol y se incluyeron en parafina. Se retiró la parafina de las secciones de 10 µm de grosor en xilenos, se rehidrataron posteriormente y se bloquearon con PBS que contiene leche en polvo desnatada al 3% durante 3 horas. Se montaron las secciones en portaobjetos de cristal que se cubrieron con poli-L-lisina para favorecer la adhesión. Se diluyó el anticuerpo a 1:1000 en PBS y se incubó este anticuerpo diluido con las secciones montadas en el portaobjetos de cristal durante 1 hora. Después de la incubación, se lavaron estas secciones tisulares extensivamente con PBS. Tras la incubación, estas secciones de tejidos se lavaron intensamente con PBS. Posteriormente, se incubaron las secciones de tejidos durante 1 hora con el anticuerpo secundario anti-IgG (diluido 1:300 en PBS) conjugado con la fosfatasa alcalina. El revelado del color se realizó en el tampón AP (Tris-HCl a 100 mM, pH 9,5, NaCl a 100 mM, MgCl₂ a 5 mM) utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indoifosfato (BCIP) (0,005% [p/v] y nitroazul de tetrazolio (NBT) (0,01% [p/v] como sustratos. Se deshidrataron y se montaron las secciones reveladas. Tal y como se muestra en la Figura 18, las plantas de *btg-26/AlaAT* expresaban el gen de la AlaAT de una forma similar a la observada en las plantas transgénicas de *btg-26/GUS*; el patrón de expresión histoespecífico fue idéntico (véase la Figura 18).

Expresión diferencial del transgén de la AlaAT en tejido foliar de las estirpes transgénicas con *btg-26/AlaAT*

La expresión histoespecífica del transgén de la AlaAT en las hojas de las plantas transgénicas que contienen la construcción *btg-26/AlaAT* previamente identificada mediante RT-PCR (véase más arriba) se confirmó utilizando análisis espectrofotométricos que miden la actividad enzimática AlaAT en extractos de hoja de plantas transgénicas y de control. Se hicieron crecer las plantas en una mezcla de maceta estándar (arena, musgo de turba, suelo y fertilizante de liberación lenta, N/P/K), con o sin tratamiento complementario de nitrógeno. Se hicieron crecer las plantas durante 5 semanas en una cámara de cultivo con condiciones estándares y se midieron el peso fresco, el peso seco, el área de la hoja y el diámetro del tallo. Se extrajeron las proteínas de las hojas moliendo el tejido foliar (0,2 gm/ml) en un mortero con tampón de extracción [Tris-HCl a 0,1 M, pH 8,0, que contiene DTT a 10 mM y glicerol al 10% (p/v)]. Se analizó la actividad AlaAT mediante un espectrofotómetro esencialmente como está descrito (Good y Muench, *ibidem*). La mezcla de reacción contenía 2-oxoglutarato a 5 mM, NADH a 0,1 mM, Tris-HCl a 100 mM (pH 8,0), 5 unidades de LDH (Sigma L1254) y 20 µl de extracto enzimático para dar un volumen final de 1 ml. Se inició la reacción con la adición de alanina a 25 mM, y se midió a 21°C el cambio de absorbencia a 340 nm. Tal y como se observa en la Figura 13, las plantas transgénicas con *btg-26/AlaAT* tienen una mayor cantidad de actividad AlaAT en el tejido foliar.

Inducción diferencial del transgén de la AlaAT en brotes y raíces utilizando sal

Se había demostrado (Ejemplo 1) que la expresión génica controlada por el promotor de *btg-26* se podía cambiar mediante un tratamiento con NaCl, de una manera dependiente de la concentración. Para determinar si la expresión histoespecífica de la AlaAT en plantas transgénicas para la construcción *btg-26/AlaAT* también se podía llevar a cabo mediante un tratamiento salino, se realizó el siguiente experimento. Se hicieron crecer las plantas hidropónicamente en una disolución nutritiva de Long Ashton modificada que contiene nitrato a 0,5 mM dentro de cámaras de cultivo en tanques de 60 l. Después de 4 semanas de edad, se añadieron diferentes concentraciones de sal al medio y se midió la cantidad de actividad AlaAT 36 horas después de la adición de NaCl, tal y como se describe en Good y Muench (1992, *ibidem*). Los resultados se muestran en las Figuras 14 y 15. Mientras que en brotes o raíces de tipo salvaje las plantas tratadas con sal muestran una disminución de la actividad de la AlaAT de acuerdo con los controles sin tratar, tanto los brotes como las raíces transgénicas con *btg-26/AlaAT* tratados con sal muestran unos aumentos significativos en la actividad AlaAT en comparación con los controles sin tratar (véase, por ejemplo, la Figura 18). Esto demuestra que la expresión del gen de la AlaAT se puede poner en marcha en tejido de raíz y de brotes añadiendo un compuesto inductor, en este caso, NaCl.

La expresión diferencial del transgén de la AlaAT, cuando se induce mediante sales, da lugar a una mayor velocidad de crecimiento en comparación con los controles sin transformar

Previamente, se había determinado (Ejemplo 4) que las plantas que llevan la construcción *btg-26/AlaAT* mejoraban el crecimiento a simple vista frente a las plantas de control en condiciones de carencia de nitrógeno o sequía. Los resultados citados más arriba demostraron que la expresión de la AlaAT dirigida por el promotor de *btg-26* es histoespecífica no sólo en los brotes (véase la Figura 14) sino también en las raíces (véase la Figura 18). Se realizaron

experimentos para determinar cuantitativamente si el tratamiento directo de las plantas transgénicas que contienen la construcción btg-26/AlaAT con NaCl da lugar a un efecto de crecimiento similar en uno o ambos de los tejidos vegetales que se demostró que tenían una expresión significativa de la AlaAT (por ejemplo, brote o raíz). Se hicieron crecer las plantas hidropónicamente en cámaras de cultivo en tanques de 60 l (tal y como se describió anteriormente) en una disolución nutritiva de Long Ashton modificada que contenía nitrato a 0,5 mM. Después de 4 semanas de edad, se añadieron diferentes concentraciones de sal a los medios y se midieron el peso seco y el peso fresco de las raíces. Tal y como se muestra en la Figura 16, hay un mayor crecimiento (medido como biomasa) en las plantas que expresan el gen de la AlaAT en tejido radical (paneles B y D) mediante la adición de un compuesto inductor (tal como el NaCl) en comparación con las plantas de control de tipo salvaje en condiciones similares (paneles A y C). Este efecto de crecimiento es suficientemente significativo para ser visualmente evidente (Figura 17); las plantas btg-26/AlaAT tratadas con NaCl a 100 mM durante 2 semanas después de una edad de 4 semanas mostradas en el lado derecho de la figura mejoraron a simple vista el crecimiento frente a las plantas de tipo salvaje tratadas en las mismas condiciones, mostradas en el lado izquierdo de la figura.

Ejemplo 6

Efecto de la expresión de btg-26/AlaAT en las plantas, sobre la biomasa vegetal y para la producción de semillas

Las plantas de *Brassica napus* transformadas que comprenden btg-26/AlaAT se prepararon como se describió en el Ejemplo 2. Se plantaron plantas transgénicas y nativas (*Westar*) dentro de macetas utilizando la práctica agronómica estándar y se hicieron crecer en condiciones de campo en presencia o en ausencia de nitrógeno añadido. En el momento de plantarlas, el suelo contenía de 35 a 50 lbs de nitrógeno disponible/acre. El grupo de control de las plantas (indicado como “bajo” en las Figuras 19 A y B) se fertilizó con potasio (K) a 20 lbs/acre, fósforo (P) a 45 lbs/acre y nitrógeno (N) a 0 lbs/acre. Las plantas tratadas (indicadas como “elevadas” en las Figuras 19 A y B) se fertilizaron con potasio (K) a 20 lbs/acre, fósforo (P) a 45 lbs/acre y nitrógeno (N) a 100 lbs/acre. El material vegetal obtenido en la etapa de zarandeo se utilizó para las determinaciones de toda la biomasa vegetal (se determinaron los pesos fresco y seco). Se determinó la producción de semillas por parcela.

Tal y como se puede observar en referencia a la Figura 19 A, la biomasa vegetal total aumentó en las plantas de control en presencia de nitrógeno “elevado” cuando se comparó con las plantas que no recibieron N adicional (“bajo” en la Figura 19 A). Sin embargo, las plantas transgénicas que expresan btg-26/AlaAT (53F y 81B) mostraron un rendimiento similar independientemente de la disponibilidad del N. Además, los rendimientos observados en las plantas transgénicas en presencia (“elevado”) o ausencia (“bajo”) de N adicional eran equivalentes a los de las plantas de control que recibieron N (“elevado”). La Figura 19 A muestra los resultados de la biomasa vegetal sobre la base del peso seco; y se observaron resultados similares a partir del peso fresco. Estos resultados demuestran que la expresión ectópica de un gen que codifica una enzima implicada en la asimilación o el metabolismo del N, por ejemplo, pero sin limitarse a ella, la AlaAT, da lugar a un aumento de la biomasa vegetal en un margen de condiciones de N.

En relación con la Figura 19 B, se puede observar que las plantas de control que reciben N adicional produjeron una mayor cantidad de semillas que las plantas crecidas en condiciones similares pero que no recibieron ningún N adicional. Sin embargo, las plantas transgénicas que expresan btg-26/AlaAT mostraron mejor rendimiento que las plantas de control en presencia o en ausencia de N adicional. Además, los rendimientos observados con las plantas transgénicas fueron equivalentes tanto con N elevado como con N bajo. Estos resultados demuestran que la expresión ectópica de un gen que codifica una enzima implicada en la asimilación o el metabolismo del N, por ejemplo, pero sin limitarse a ella, la AlaAT, da lugar a un aumento de la producción de semillas, en un margen de condiciones de N.

En conjunto, estos resultados indican que las plantas transgénicas que expresan ectópicamente una enzima implicada en la asimilación o el metabolismo del N son capaces de optimizar la utilización del N disponible en un margen de condiciones de N disponible, lo que da lugar a un aumento de la biomasa de la planta, de la producción de semillas o una combinación de las mismas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para dirigir la expresión específica de raíz de un gen deseado, que comprende: producir una planta a partir de una célula vegetal transformada de tal forma que la expresión de un gen deseado se produce preferiblemente en la raíz, en el que la célula vegetal transformada comprende un gen deseado unido operativamente a un elemento del promotor del gen 26 de la turgencia de *Brassica* tal y como se define en la SEQ ID NO: 1, o un fragmento del mismo cuyo fragmento dirige la expresión del gen deseado preferiblemente en la raíz.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la expresión del gen deseado se regula además por el entorno o por el desarrollo.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el gen deseado codifica una enzima implicada en la asimilación y/o el metabolismo del nitrógeno.
- 15 4. El método de la reivindicación 3, en el que la enzima se elige entre alanina deshidrogenasa, glutamina sintetasa, asparragina sintetasa, glutamato sintasa, asparragina, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y glutamato deshidrogenasa.
- 20 5. El método de la reivindicación 4, en el que la enzima se elige entre alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa.
6. El método de la reivindicación 4, en el que la enzima es alanina aminotransferasa.
- 25 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la planta es canola, cebada, maíz, arroz, tabaco, soja, algodón, alfalfa, tomate, trigo o patata.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el fragmento de la SEQ ID NO: 1 es el fragmento definido en la SEQ ID NO: 2.
- 30 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el fragmento de la SEQ ID NO: 1 es el fragmento definido en la SEQ ID NO: 3.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el fragmento de la SEQ ID NO: 1 es el fragmento definido en la SEQ ID NO: 4.
- 35 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el fragmento de la SEQ ID NO: 1 es el fragmento definido en la SEQ ID NO: 5.
- 40 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el fragmento de la SEQ ID NO: 1 es el fragmento definido en la SEQ ID NO: 6.

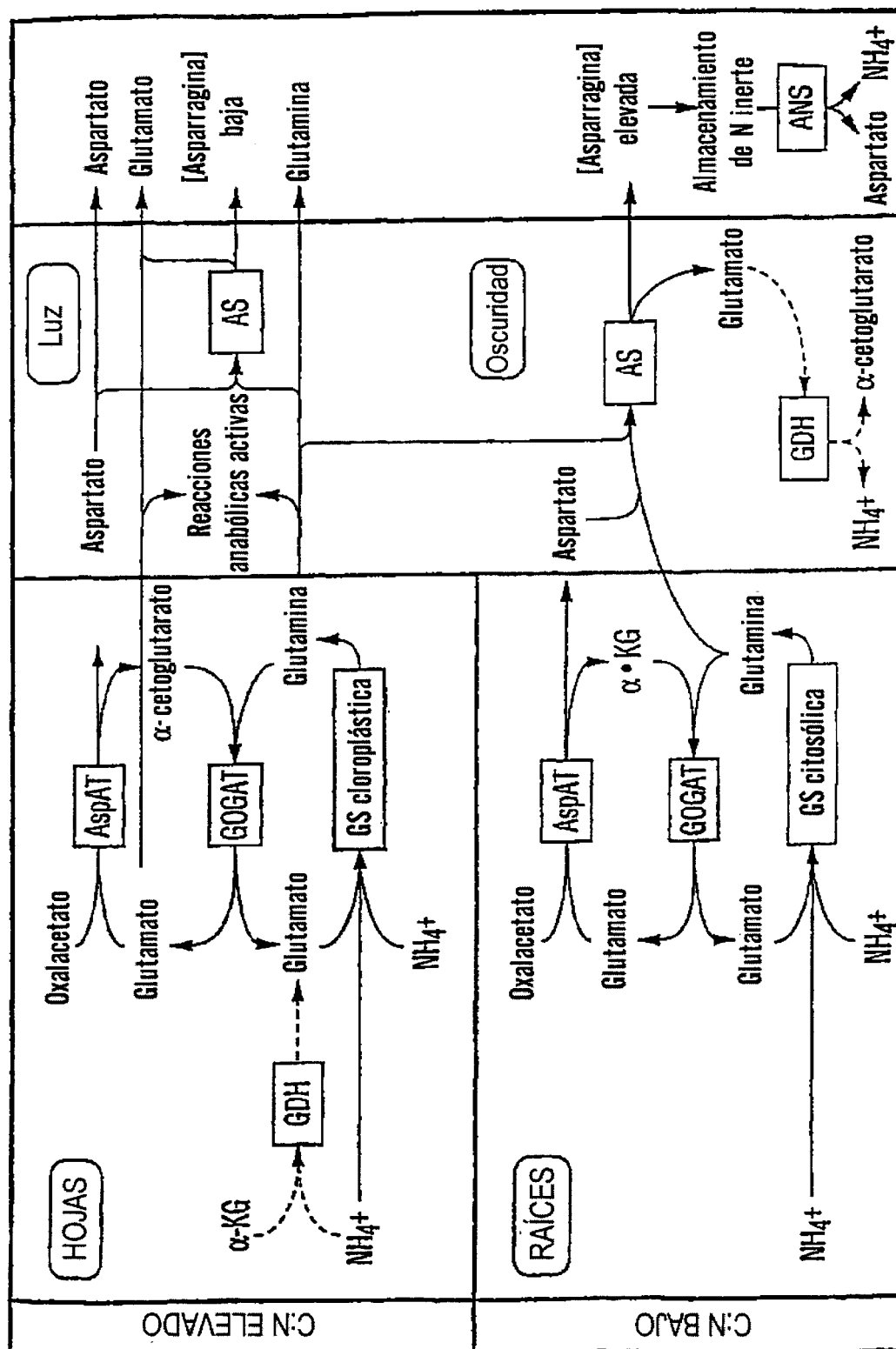


FIG. 1

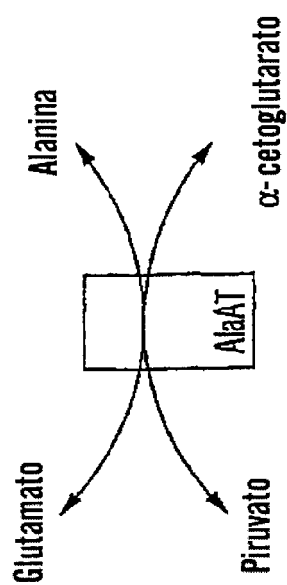


FIG. 2

GTCGACCTGCGAGGTCAACGGATCCTAAATCGGGGTATATCCCGACCCGGAAAAAGAAACGTAGGACACGTTG
 -250
 ACAAAACTTTCATATGATCCGAGTGAATCAAGCCAAAAGGGGGATTGACACACAAGCTCAGCTTTTCGTTT
 -180
 CCGTCCAAATCGCTGTTCCTCAACTTTACTTACAAGTCGTACACGTCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCACTC
 -110
 ACTTCCCTCTTATAAAGACTCTCTGATCAAAACGTATAATCGGAAAACTCCATTCTTTGATACCATCGATAA
 -40
 TACTAAGAGAGGTGATTGATTCCTTTAATCACTGTTTGATATCCCTTAACTTTGATCCCATTTACTCTGTTCA
 31
 ATCATTTTTGTAGAG

3
6
F

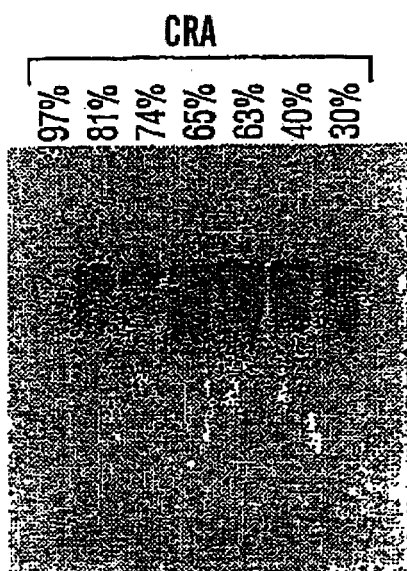


FIG. 4A

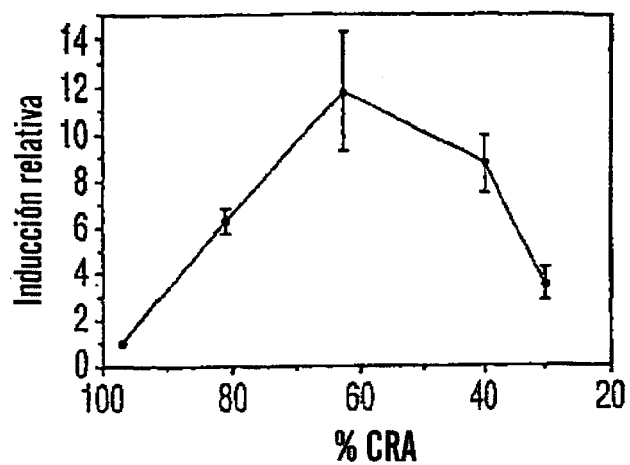


FIG. 4B

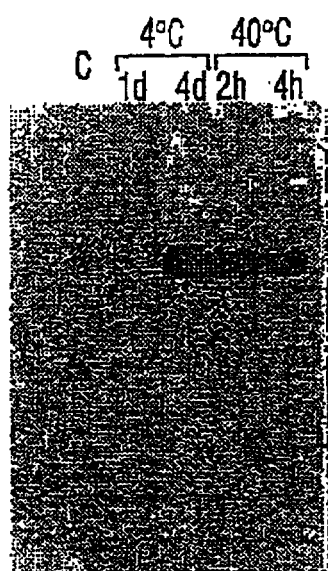


FIG. 4C

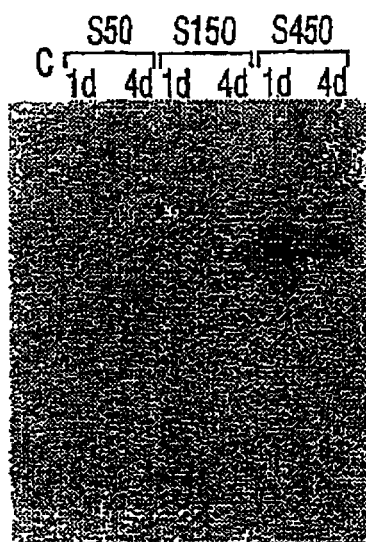


FIG. 4D



FIG. 4E

GGCCACAAACCCGCGGAAGAGNTAGACGGACAGCTAGAGCGCTCGGAAGATATCTCGCTGCTGCGCCGCCCTTCGTCTAGTTGATCTCGCC
94
ATGGCTGCCACCGTCCGTGGACAACTGGAACCCCAAGGTTTAAATGTGAGTATGCTGTGGGTGGAGAGATTGTATCATCATGCTCAGCGCTTG
190
M A A T V A V D N L N P K V L K C E Y A V R G E I V I H A Q R L
32
CAGGACAGCTAAAGACTCAACCAAGGCTCTACCTTTTGATGAGATCTCTATTGTAAACNTTGGGAACCCACAATCTCTTGGTCAGCAACCAAGTT
286
Q E Q L K T Q P G S L P F D E I L Y C N I G N P Q S L Q Q Q P V
64
ACATCTTCAGGGAGGTTCTTGCCCTTTGTGATCATCAGACCTGTGCAAGAGAGGAAATCAAAACANTTGTTCAGTGTGATTTCTATTTCTCGA
382
T F F R E V L A L C D H P D L L Q R E E I K T L F S A D S I S R
96
GCNAAGCAGATTCTTGCCNTGATACCTGGAAGAGCAACAGGAGCATACAGCCATAGCCAGGGTATTAAAGGACTTCGTGATGCAATTGCTTCTGGG
478
A K Q I L A M I P G R A T G A Y S H S Q G I K G L R D A I A S G
128
ATCGCTTCACGAGATGGATTCCCTGCTAATGCTGNTGACATTTTCTACAGATGGAGCAAGTCTCTGGGTGCACTGTATGATGCAATTACTGATA
574
I A S R D G F P A N A D D I F L T D C A S P G V H L M Q L L I
160
AGGAATGAGAAAGATGGCAATTCTGTCCCGATTCTCAGTACCCCTTGTACTCGGCTCCATAGCTCTTCATGCGGAGCTCTGTGCCATCTAT
670
R N E K D G I L V P I P Q Y P L Y S A S I A L H G G A L V P Y Y
192
CTCAATGAAATCGACGGGCTGGGTTTGCAACCTCTGATGTTAAGAACCACTTGAAAGATGCTCGGTCAAGAGGCATCAACGTTAGGGCTTTGGTG
766
L N E S T G W G L E T S D V K K Q L E D A R S R G I N V R A L V
224
GTTATCAATCCAGGAATCCAACCTGGACAGGTACTTGCTGAGAAACCAATATGACATAGTGAAGTTCTGCAAAATGAGGGTCTTGTCTCTTA
862
V I N P G N P T G Q V L A E E N Q Y D I V K F C K N E G L V L L
256
GCTGATGAGGTATACCAAGAGAACATCTATGTTGACAAAGAAATCCACTCTTTCAAGAAAGATAGTGAGATCCTTGGGATACGGCGAGGAGAT
958
A D E V Y Q E N I Y V D N K K F H S F K K I V R S L G Y G E D
288

FIG. 5

CTCCCTCTAGTATCATATCAATCTGTTTCTAAGGGATATTATGCTGAGTGTGGTAAAGAGGTTGGTTACTTTGAGATTACTGGCTTCAGTGTCTCCA
L P L V S Y Q S V S K G Y Y G E C G K R G G Y F E I T G F S A P 1054
320
GTAAGAGCAGATCTACAAATATAGCATCMGTGAACCTATGCTCCAAATATCACTGGCCAGATCCCTTGCTAGTCTTGTCTATGAACCCACCACCAAGGCT
V R E Q I Y K I A S V N L C S N I T G Q I L A S L V M N P P K A 1150
352
AGTGATGATCATACGCTTCATACAGGCAGAAAGATGGAACTCTCGCATCTTTAGCTCGTGTGCGAAGGCNTTGGAGCANTGCATTCCAATAAA
S D E S Y A S Y X A E K D G I L A S L A R R A K A L E H A F N K 1246
384
CTTGAGGGAAATTACTTGCAACGAGGCTGAAGGAGCAATGTACGTGTTCCCTCAAAATCTGTCTGCCACAGAGGCRATTGAGGCTGCTAAAGCTGCT
L E G I T C N E A E G A M Y V F P Q I C L P Q K A I E A A K A A 1342
416
AACAAAGCACCTGATGCATTCTATGCTCTCTCGAGTCGACTGGAAATCGTCTGTTGTCCTGGATCAGGANTTTGGCCAGGTTTCCTGGCACA
N K A P D A F Y A L R L L E S T G I V V P G S G F G Q V P G T 1438
448
TGGCACTTCAGGTGCACGATCCCTTCGGCAGGAGGATAAGATCCCGGCAGTCATCTCCCGTTCACGGTGTTCATGAGGCGTTTCATGTCAGAGTAT
W H F R C T I L P Q E D K I P A V I S R F T V F H E A F M S E Y 1534
480
CGTGACTAAACTGGTGCAACATGTGGGATTACATACAAACCTCATGSGGTTTTTCGTAGGCGTTCTTGTTTTGCCCCCCCCCTTCTCTCTCTC
R D 1630
482
TCTCTCTCTGACAGCATCCTCTTAGATGAGACAAATAAAGCAAAAGCCATGTCATCCTTAAATAAAAAA 1701

FIG.5 Cont.

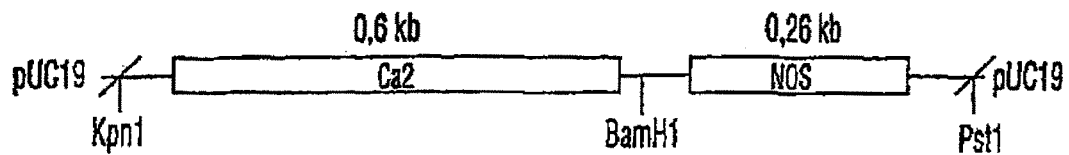


FIG. 6

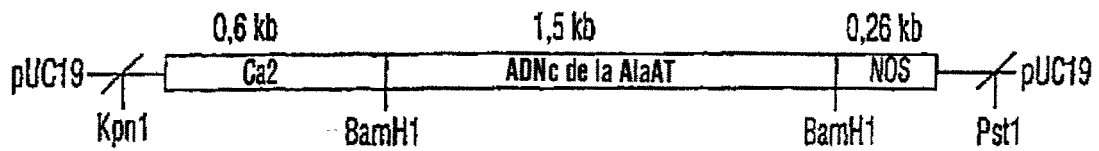


FIG. 7A

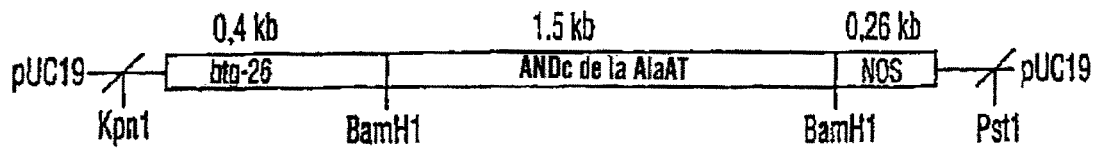


FIG. 7B



FIG. 7C

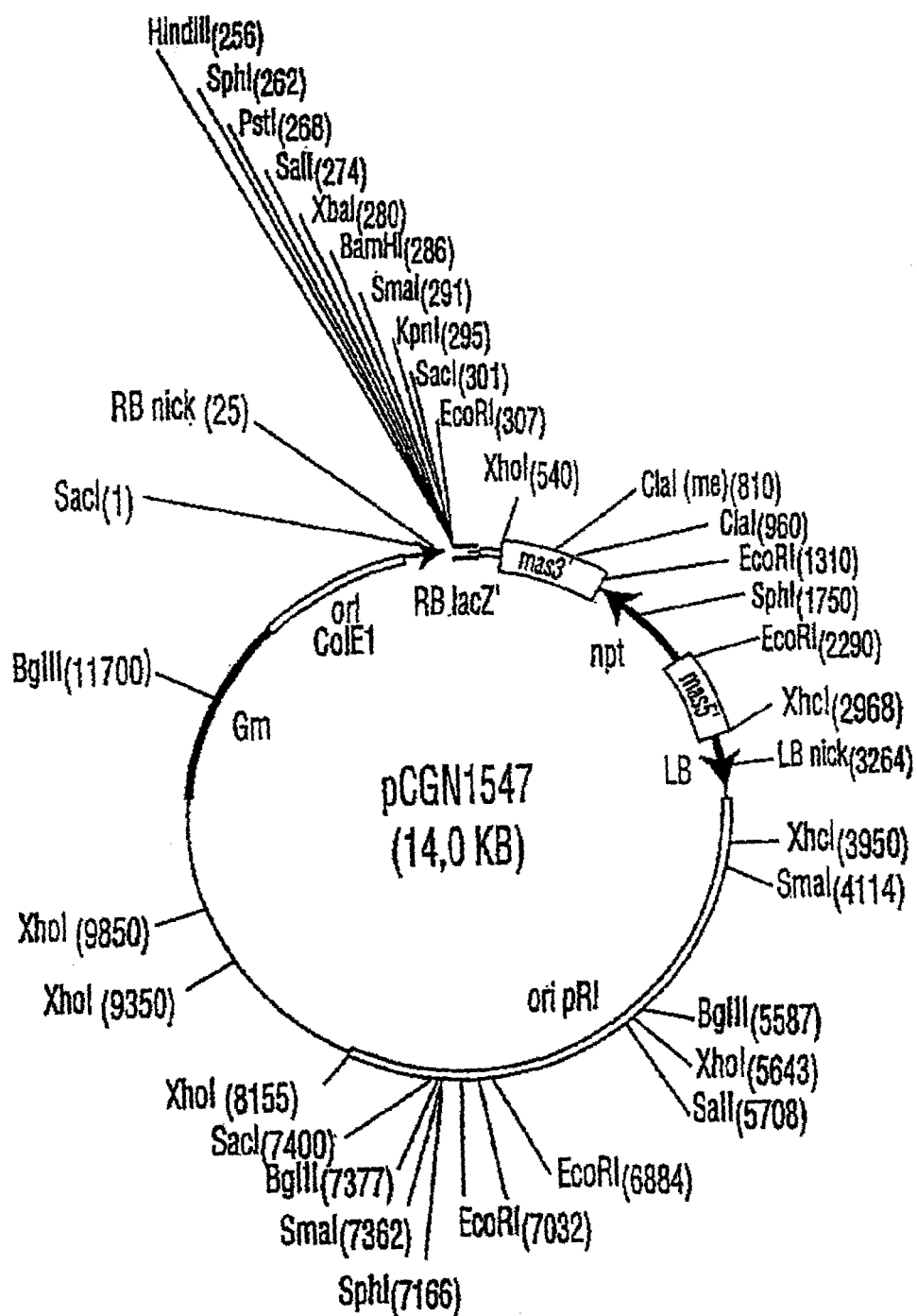


FIG. 8



FIG. 9

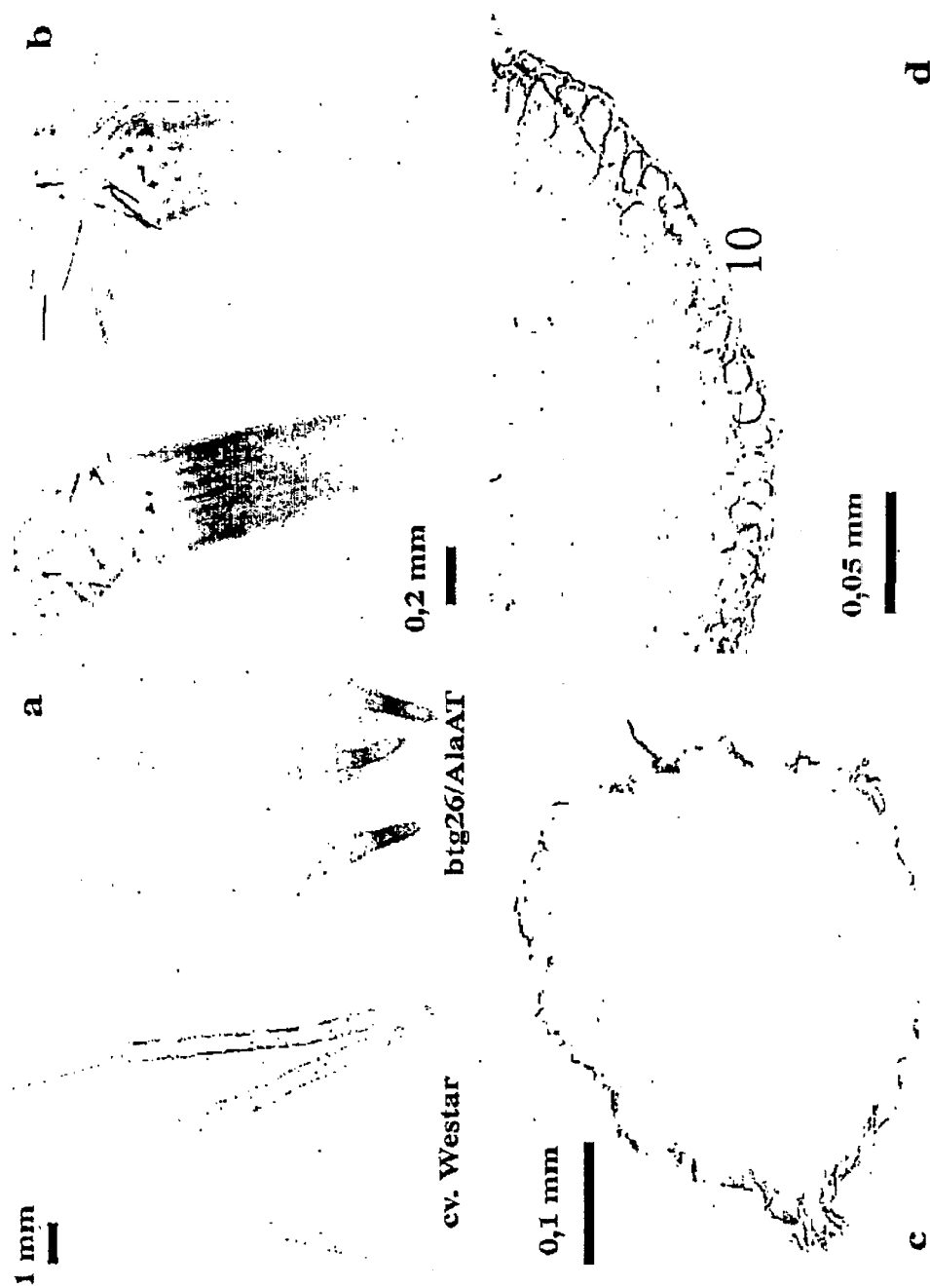


FIGURA 10

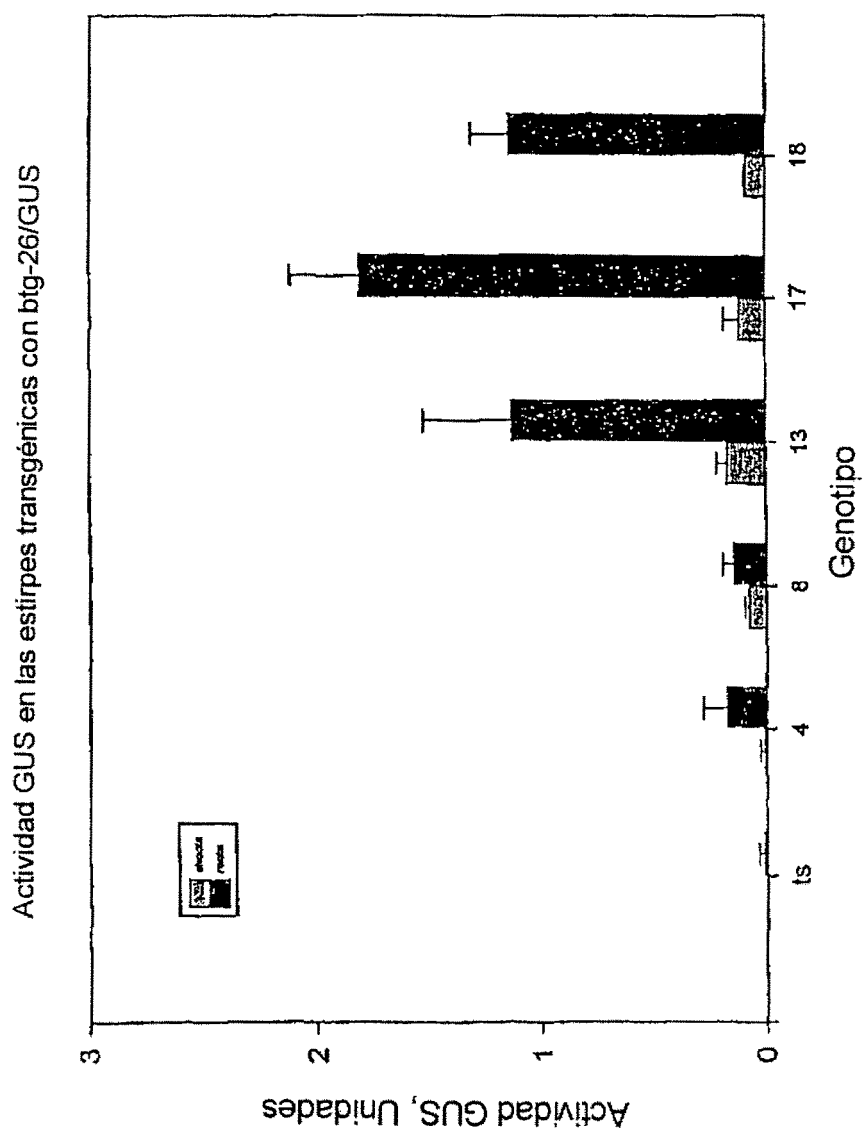


FIGURA 11

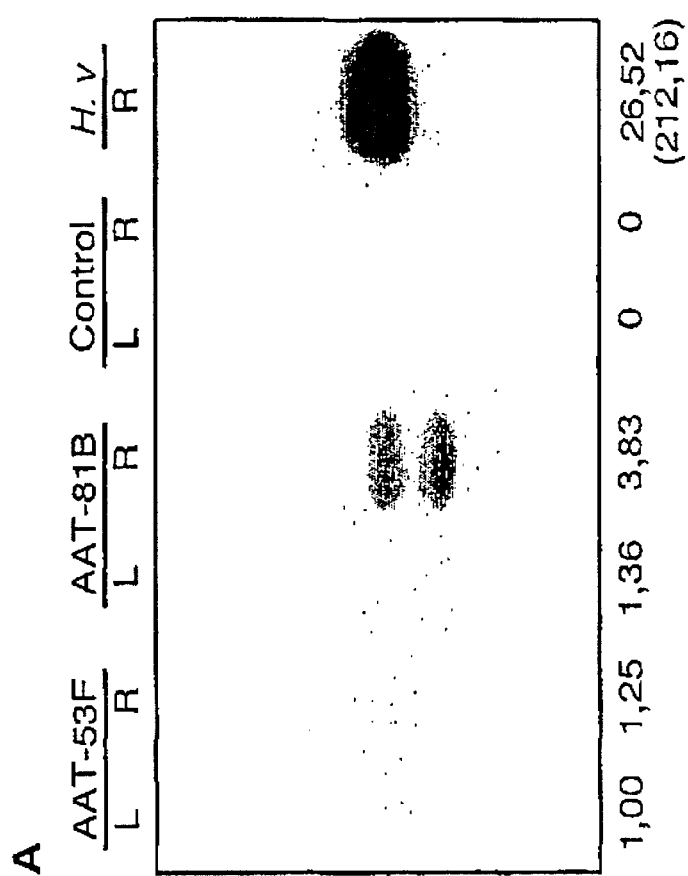


Figura 12

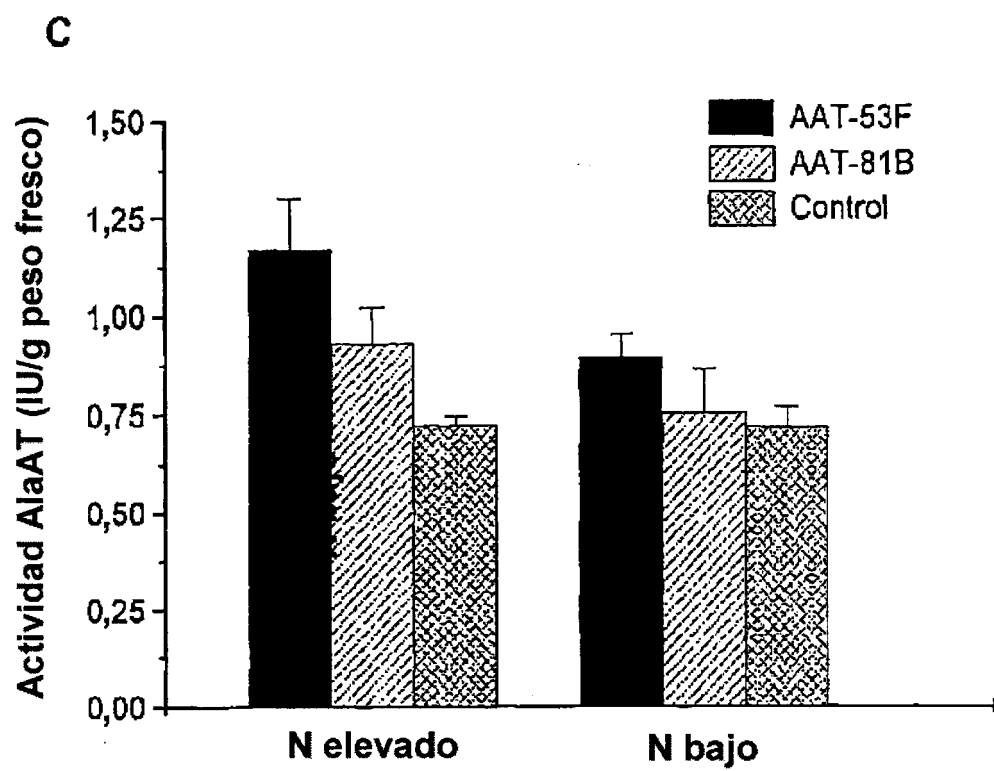


FIGURA 13

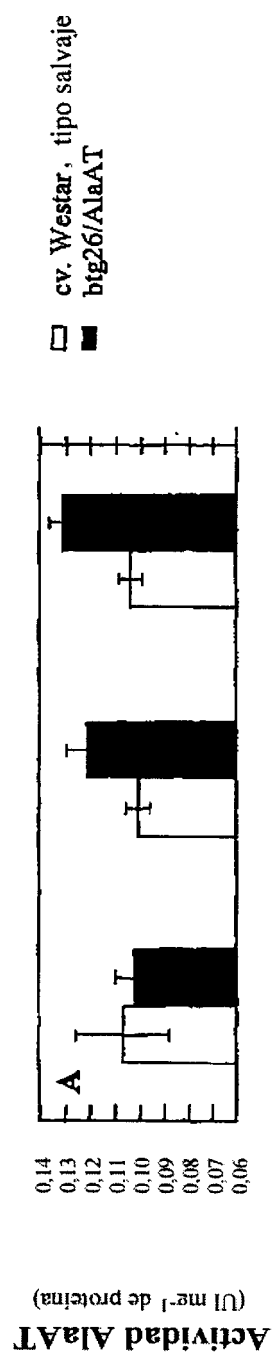


FIGURA 14

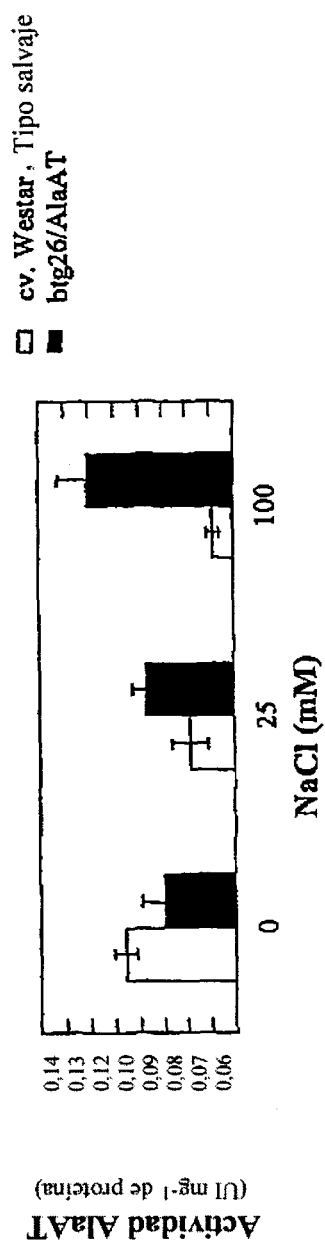


Figura 15

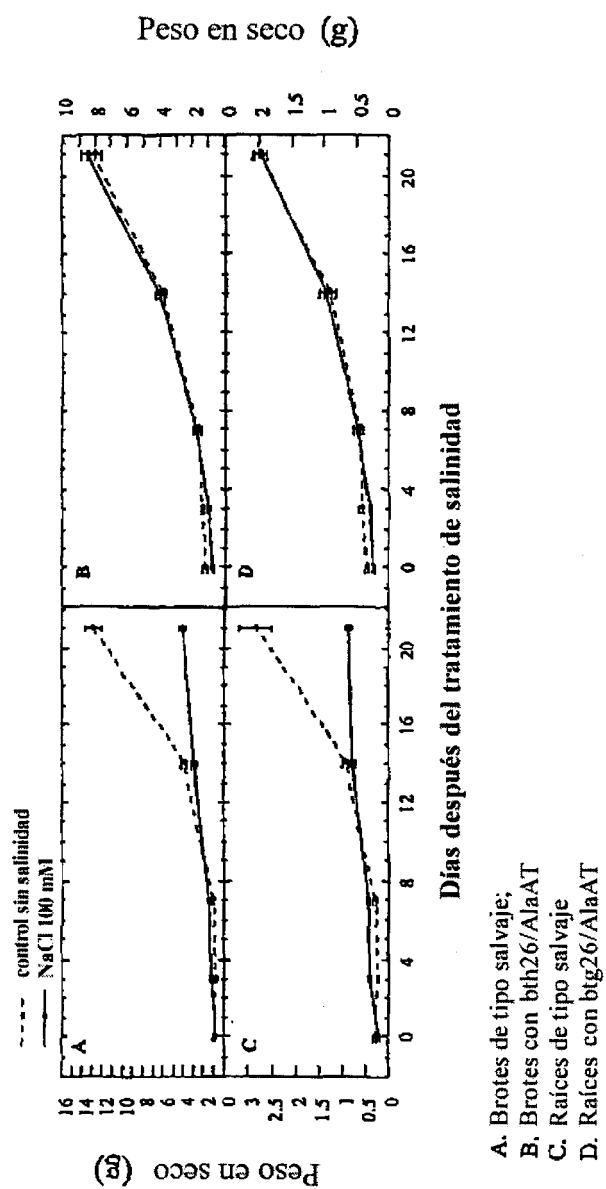


Figura 16

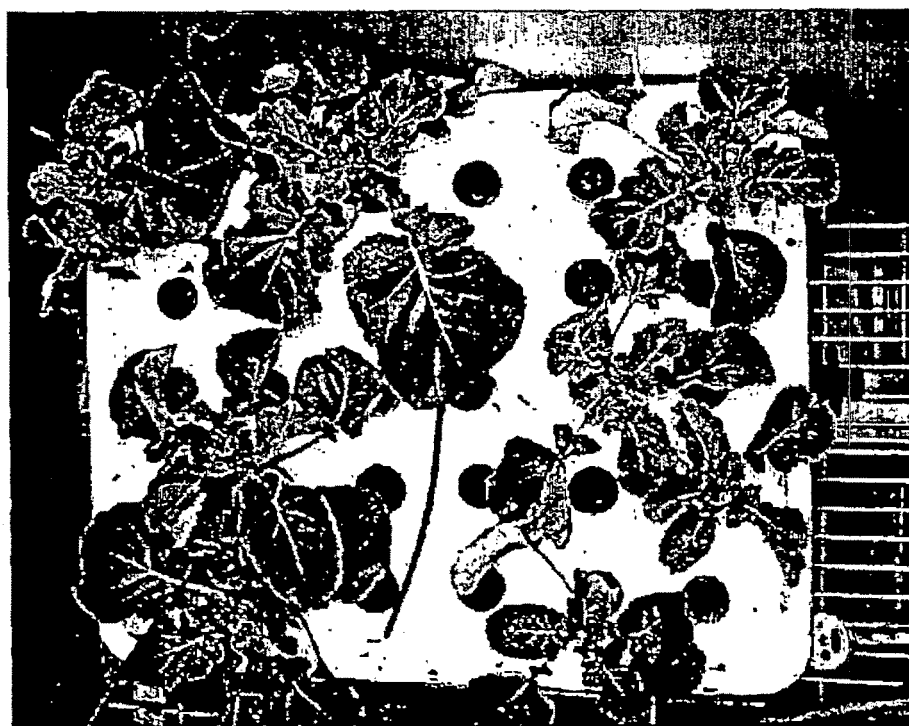


FIGURA 17

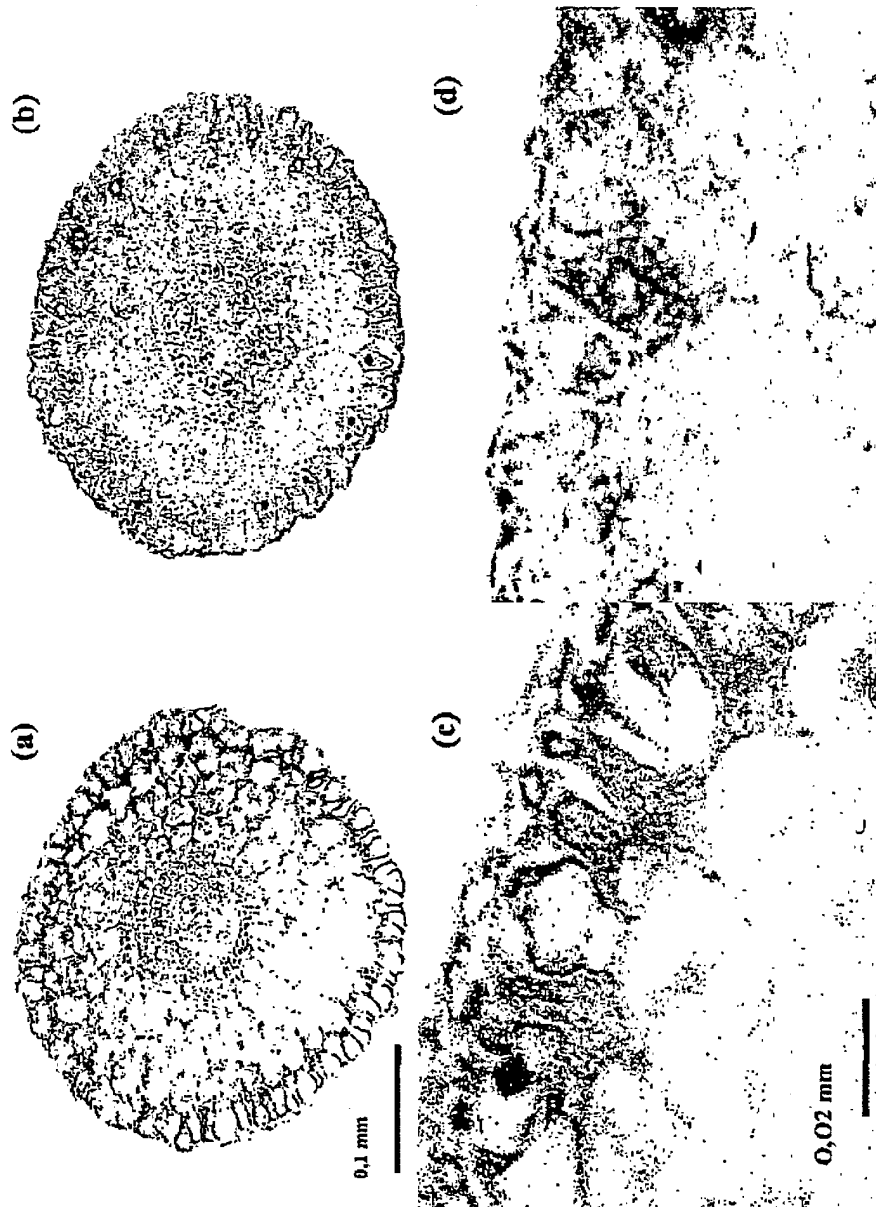


Figura 18

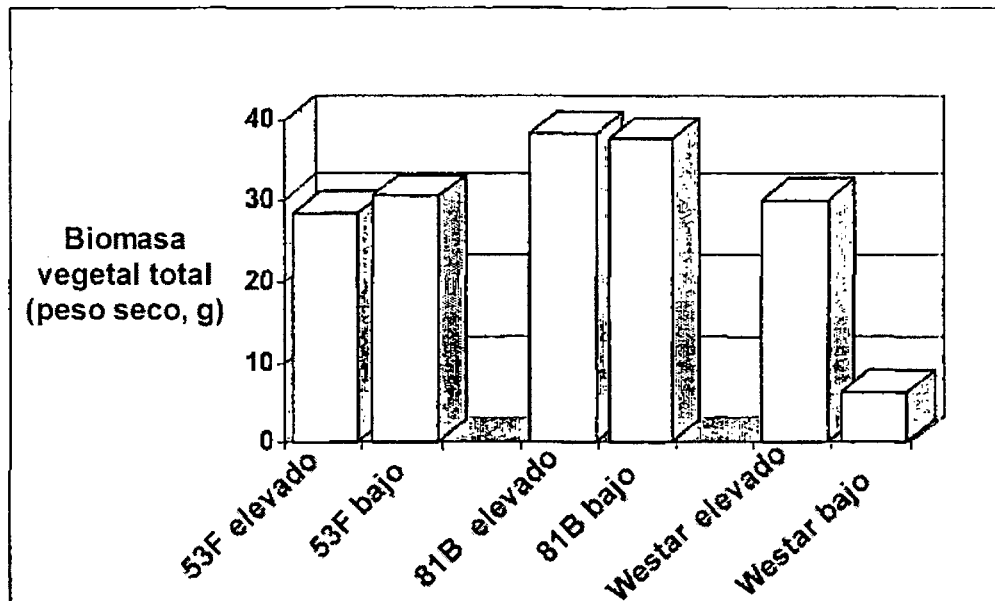


Figura 19(A)

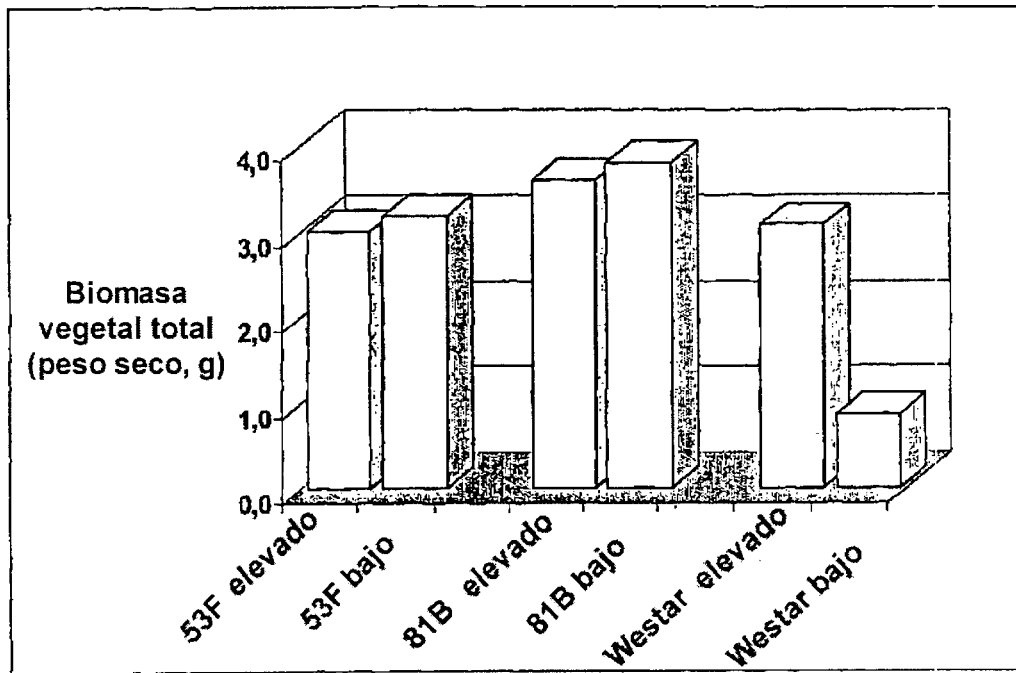


Figura 19(B)